

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**Expresión de Inhibina B y del Receptor de
Andrógenos en las Células de Sertoli: Su
Relación con los Diferentes Patrones
Histopatológicos de la Disgenesia Testicular**

TESIS DOCTORAL

ROALD EDUARDO GÓMEZ PÉREZ

Madrid, septiembre de 2010

MARÍA DEL PILAR GONZÁLEZ-PERAMATO GUTIERREZ, PROFESORA ASOCIADA DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y MÉDICO ESPECIALISTA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ DE MADRID,

JAVIER FRANCISCO REGADERA GONZÁLEZ, MÉDICO PATÓLOGO Y PROFESOR TITULAR DE HISTOLOGÍA, DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID, y

MANUEL NISTAL MARTÍN DE SERRANO, CATEDRÁTICO DE HISTOLOGÍA DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y JEFE DE SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ DE MADRID

CERTIFICA QUE: D. ROALD EDUARDO GÓMEZ PÉREZ, licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela y Médico Especialista en Medicina Interna y Endocrinología ha realizado bajo nuestra dirección el estudio: **“Expresión de Inhibina B y del Receptor de Andrógenos en las Células de Sertoli: Su relación con los diferentes patrones Histopatológicos de la Disgenesia Testicular”**. Este trabajo de investigación lo consideramos completamente satisfactorio e idóneo para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid.

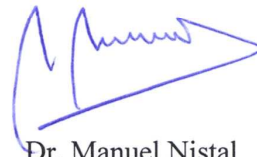
Lo que firmamos en Madrid a 3 de septiembre de 2010



Dra. Pilar González-Peramato



Dr. Javier Regadera



Dr. Manuel Nistal

AGRADECIMIENTOS:

a la Dra. **Pilar González-Peramato**, por su contribución a la evaluación del material histopatológico y por sus constructivas críticas científicas en la interpretación y en la redacción final de la presente Tesis Doctoral

al Prof. **Javier Regadera**, por sus enseñanzas científicas y dirección de esta Tesis Doctoral; su permanente y paciente dedicación durante la elaboración y evaluación de los resultados, así como durante la escritura de los diferentes manuscritos preliminares y de la versión final de esta Tesis es digna de especial gratitud

al Prof. **Manuel Nistal**, por su magisterio internacional en el estudio de la Histofisiología y de la Patología del testículo humano, y por su rigurosas aportaciones en la interpretación y discusión de los resultados.

al Prof. **José María Peña**, por su amable disposición para ser Tutor dentro del Programa de Doctorado de Medicina

al Prof. **Alfonso Osuna**, de la Universidad de Los Andes de Mérida, Venezuela, quien con su magisterio y humanidad ha sido mi guía como persona y endocrinólogo

a la Prof^a. **Ingrid Tortolero**, de la Universidad de Los Andes de Mérida, Venezuela, porque me formó en la evaluación de los estudios bioquímicos y morfológicos de los pacientes andrológicos, y por su sincera amistad

a la Dra. **Inmaculada Santos Álvarez**, por sus constructivas críticas científicas durante la edición de los resultados de la presente Tesis Doctoral

a Dña. **Carmen Sánchez-Palomo**, por su calidad humana y excelente trabajo inmunohistoquímico

a todos los **Profesores** que generosamente con sus enseñanzas participaron en mi formación en la **Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela)** y en la **Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela**

A **mis padres**, que tanto han contribuido en mi crecimiento humano e intelectual

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
INFERTILIDAD	7
<i>Evaluación del Hombre con Problemas de Infertilidad</i>	7
<i>Etiología de la Infertilidad Masculina</i>	10
Causas Pre-Testiculares	10
Causas Testiculares	11
Causas Post-Testiculares	17
<i>El Laboratorio en la Evaluación del Hombre Infértil</i>	18
Análisis del Semen	18
Evaluación Endocrina: Estudios Hormonales	21
RECEPTOR DE ANDRÓGENOS: SU PARTICIPACIÓN EN LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL TESTÍCULO NORMAL Y PATOLÓGICO	25
ALTERACIONES DE LA EXPRESIÓN DEL RA EN PATOLOGÍA TESTICULAR	27
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
MATERIAL Y MÉTODOS	32
MATERIAL	33
GRUPOS DE ESTUDIO	33
MÉTODOS	34
<i>Métodos de Estudio Histológico General</i>	34
Fijación de las Piezas	34
<i>Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas</i>	35
<i>Método Inmunohistoquímico para la Detección de Inhibina B</i>	36
<i>Métodos Morfométricos</i>	39
Valoración Microdensitométrica de la Expresión de Inhibina B y del Receptor de Andrógenos	39
<i>Métodos Estadísticos</i>	40
<i>Técnicas Fotográficas</i>	41

RESULTADOS	42
EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE INHIBINA B Y DEL RA	43
<i>Iconografía</i>	46
EVALUACIÓN MICRODENSITOMÉTRICA DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE INHIBINA B EN LAS CÉLULAS DE SERTOLI NORMALES	60
COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE INHIBINA B EN EL TESTÍCULO DEL HOMBRE ADULTO Y ANCIANO NORMALES Y DE LOS PACIENTES CON CRIPTORQUIDIA	63
<i>Cuantificación Microdensitométrica de la Expresión de Inhibina B en las Células de Sertoli Normales y de Pacientes con Criptorquidia</i>	63
<i>Cuantificación Microdensitométrica de la Expresión de Inhibina B en las Células de Leydig Normales y de Pacientes con Criptorquidia</i>	64
<i>Comparación de Inhibina B entre Testículo y Vía Espermática</i>	66
COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN EL TESTÍCULO DEL HOMBRE ADULTO Y ANCIANO NORMALES Y DE LOS PACIENTES CON CRIPTORQUIDIA	68
<i>Cuantificación Microdensitométrica de la Expresión del Receptor de Andrógenos (RA) en las Células de Sertoli Normales y de Pacientes con Criptorquidia</i>	68
<i>Cuantificación Microdensitométrica de la Expresión del RA en las Células de Leydig Normales y de Pacientes con Criptorquidia</i>	69
<i>Comparación del RA entre Testículo y Vía Espermática</i>	70
CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE INHIBINA B Y LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS	72
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	94
RESUMEN	97
SUMMARY	100
REFERENCIAS	103

INTRODUCCIÓN

INFERTILIDAD

La infertilidad es la incapacidad de la pareja para lograr un embarazo después de intentarlo durante un año, con relaciones sexuales frecuentes y sin medidas anticonceptivas.⁷⁶ La prevalencia de la infertilidad varía en las diferentes regiones geográficas.^{52,57,78,83,161} De acuerdo con la definición anterior, la infertilidad afecta al 10-15% de todas las parejas. Si se toma como límite 2 años de relaciones sexuales frecuentes sin medidas anticonceptivas, la prevalencia para Europa y Norteamérica sería del 5 al 6%.⁵²

Las causas de la infertilidad, en general, son clasificadas en cuatro categorías según el factor involucrado:⁶⁶

1. las atribuidas al factor femenino
2. las atribuidas al factor masculino
3. Los factores compartidos por ambos miembros de la pareja
4. la infertilidad de causa no establecida.

La distribución de los porcentajes para cada una de estas categorías no ha sido claramente establecida. De acuerdo con un estudio multicéntrico coordinado por la OMS,⁴⁸ el 20% de los casos fueron atribuidos al factor masculino; el 38%, al femenino; el 27%, a factores causales compartidos por ambos miembros de la pareja; y el 15%, a causas no establecidas. Este estudio ha sido objeto de muchas críticas por la desigualdad de los centros que participaron en él. Otros investigadores simplifican el problema atribuyéndole al factor masculino un 50% y otro 50% al factor femenino;¹⁰⁸ y la mayoría está de acuerdo en considerar que en el 15% de los casos no se encuentra un factor atribuible a ninguno de los miembros de la pareja.⁶⁶

Puesto que la infertilidad es un problema de salud de la pareja, ésta debe ser evaluada conjuntamente y de manera integral.

Evaluación del Hombre con Problemas de Infertilidad

La evaluación del hombre que consulta por infertilidad nos debe conducir a la identificación de los factores causales. Su etiología es muy variada por lo que se debe diseñar una estrategia que permita una correcta orientación diagnóstica y un tratamiento adecuado. Aproximadamente en el 35-40% de los casos no se encuentra un factor etiológico

específico.⁵⁷ La fertilidad en el varón requiere una espermatogénesis normal, la cual a su vez depende del control hormonal hipotálamo-adenohipofisario¹⁵⁵ y de otros factores que la regulan; es esencial la normalidad de las vías seminales y en particular la función de las glándulas genitales accesorias, y es indispensable la normalidad de la conducta⁹² y la función sexual para garantizar el transporte del semen hasta la vagina mediante relaciones sexuales en días ideales del ciclo ovárico. Con base a estas premisas es posible agrupar las causas más importantes de infertilidad en el varón en tres categorías (Tabla 1):

1. Infertilidad de causas **pre-testiculares**
2. Infertilidad de causas **testiculares**
3. Infertilidad de causas **post-testiculares**

Tabla 1. Factores Etiológicos en la Infertilidad Masculina¹

CAUSAS PRE-TESTICULARES	CAUSAS TESTICULARES	CAUSAS POST-TESTICULARES
<i>Anomalías cromosómicas</i>	<i>Congénitas</i>	<i>Obstructivas</i>
<i>Hormonales</i>	• Criptorquidia	• Epididimarias
• Hipogonadismo hipogonadotrópico	• Síndrome del flagelo inmóvil	1. Congénitas
• Hiperprolactinemia	<i>Infecciosas (orquitis)</i>	2. Infecciosas
<i>Trastornos coitales</i>	<i>Vascular</i>	• De los deferentes
• Frecuencia coital	• Torsión testicular	1. Congénita
• Disfunción sexual eréctil	• Varicocele	2. Adquirida
1. Psicosexual	<i>Agentes antiespermatogénesis</i>	<i>Hostilidad epididimaria</i>
2. Endocrino/neural (neuropatía diabética, paraplejia, drogas)	• Quimioterapia	• Astenozoospermia epididimaria
• Disfunción eyaculatoria	• Drogas	<i>Infección de las glándulas accesorias</i>
1. Psicosexual	• Radiaciones ionizantes	<i>Inmunológicas</i>
2. Cirugía génitourinaria	• Calor	
3. Neural	<i>Inmunológicas</i>	
4. Relacionada con drogas	<i>Idiopáticas</i>	

¹ (Tomada y modificada de referencia #83)

La evaluación del hombre con problemas de infertilidad se inicia con la historia clínica y el examen médico integral. De esa manera indagamos sobre factores heredo-familiares con base genética; nos informará sobre la secuencia de los diferentes estadios del desarrollo hasta la etapa adulta; obtendremos información sobre patologías del sistema endocrino-reproductor

en edades tempranas de la vida, como la criptorquidia e hipospadias y el varicocele en la adolescencia, así como el antecedente de procedimientos quirúrgicos en las regiones ínguino-escrotales o de tratamientos con productos hormonales. Obtenemos información sobre traumatismos o infecciones urogenitales, en particular sobre enfermedades de transmisión sexual; sobre la posible exposición a tóxicos ambientales (enfermedades profesionales), calor excesivo sobre los genitales externos, la ingestión de bebidas alcohólicas y el uso de tabaco y otras sustancias que pueden alterar el sistema endocrino-reproductor. Se obtiene información sobre enfermedades endocrino-metabólicas, como la diabetes mellitus, padecimientos de la glándula tiroides o de las adrenales; tendremos información sobre padecimientos crónicos del sistema respiratorio y de las vías digestivas, así como el tratamiento para enfermedades como la hipertensión arterial. Se debe buscar información sobre la estabilidad emocional, individual, familiar y social de la pareja; sobre la función sexual y sobre la frecuencia coital. Es decir, la historia de vida y salud del hombre que consulta por infertilidad y la de su pareja deben quedar registrados en la historia clínica.¹⁸¹

El examen médico integral permite comprobar el estado de buena salud del varón infértil. La evaluación clínica debe ser acuciosa. Se evaluará su desarrollo somático: su biotipo, el grado de virilización, su altura y peso corporal, la frecuencia cardíaca y la presión arterial. Se calculará el índice de masa corporal (IMC) y la distribución de la grasa corporal: índice cintura/cadera. Comprobar la normalidad de sus caracteres sexuales secundarios y la ausencia de ginecomastia. Se realiza el examen de los genitales externos: del pene, del contenido escrotal; la posición, consistencia y volumen de los testículos (≥ 15 ml) y el examen de los conductos deferentes. Descartar la agenesia bilateral de los conductos deferentes, la presencia de varicocele y la existencia de alteraciones del epidídimo. El examen se completa con la evaluación urológica practicada por el especialista.¹⁸¹

La evaluación del hombre infértil debe conducir a la identificación del factor causal, pero además debe tener igual relevancia para orientar sobre las alternativas terapéuticas y para hacer consideraciones sobre las probabilidades de éxito del tratamiento, ofreciendo suficiente información sobre riesgos y costos del mismo. De no ser así, en un corto plazo surgirán problemas, generados fundamentalmente por las expectativas que hayamos creado en el hombre que consulta por infertilidad y en su pareja.

Etiología de la Infertilidad Masculina

Causas Pre-Testiculares

La deficiencia de GnRh hipotalámica constituye la anormalidad endocrina base en el hipogonadismo hipogonadotrópico y el **síndrome de Kallmann**. Secundario a esto hay una alteración de la secreción de las gonadotropinas hipofisarias. En el síndrome de Kallmann el defecto de secreción de GnRh es debido a una alteración embrionaria en la formación de las neuronas del hipotálamo basal que secretan dicha hormona asociado a una afectación de los bulbos olfatorios. Es una enfermedad genética donde se involucra el brazo corto del cromosoma X, el gen Kal-1. Las características clínicas típicas son pacientes con antecedente de criptorquidia y micropene asociado a retardo puberal y anosmia. Otros síndromes pueden asociarse a hipogonadismo, pero se observan principalmente en la infancia como el síndrome de Prader-Willi, Bardet-Biedl, Laurence-Moon, entre otros. La hipoplasia suprarrenal congénita Ligado al cromosoma X debido a las mutaciones del gen de DAX-1 está frecuentemente asociada a hipogonadismo hipogonadotrópico.²⁹

Déficit secundario de GnRh, una alteración en la región del diencefalo puede causar alteración en la secreción hipotalámica de GnRh. La localización y la extensión del daño determinan el cuadro clínico. Los tumores en el diencefalo, como los craneofaringiomas, meningiomas y metástasis de otros tumores pueden causar deficiencia de GnRh. Las enfermedades granulomatosas como la micosis profunda, sarcoidosis, histiocitosis y la hemocromatosis pueden alterar la función hipotálamo – hipofisaria.

Enfermedades crónicas como la enfermedad de Crohn, enfermedad celiaca, la anemia falciforme, talasemia, fallo renal, síndromes de mala absorción, anorexia nerviosa, etc. pueden alterar la secreción de neurotransmisores a nivel hipotalámico, condicionando un fallo en la secreción de GnRh.

Insuficiencia hipofisaria, siendo las causas más frecuentes de insuficiencia hipofisaria los tumores, entre los cuales el adenoma hipofisario productor de prolactina es el más frecuente. Los síntomas clínicos son determinados por el tiempo en que ocurre la insuficiencia. La insuficiencia pituitaria prepuberal causa los cambios de la proporción corporal caracterizada por hipogonadismo; sin embargo, debido a la deficiencia de la hormona de crecimiento, el aspecto típico es de eunocoidismo. Además de los síntomas de déficit

androgénico, se asocian la clínica de otros déficits hormonales como el de la tiroides y la adrenal. Cuando el daño aparece después de la pubertad los síntomas clínicos se asocian con disminución de la libido, infertilidad y disfunción eréctil.

Los **deficits aislados de gonadotropinas**, el déficit aislado de LH se caracteriza por un estado de eunuco fértil, cuadro clínico de hipogonadismo con un volumen testicular normal. La histología testicular muestra preservación cualitativa, más no cuantitativa, de la espermatogénesis con atrofia de las células de Leydig. Los estudios hormonales determinan niveles normales de FSH con niveles bajos de LH. La administración de GCh reestabiliza los niveles de testosterona sérica.¹⁵²

El **deficit aislado de FSH** ha sido descrito como una alteración propia de la espermatogénesis¹⁵⁵, con actividad normal de LH, por lo que ocurre una virilización normal. En estos pacientes la estimulación con GnRh induce una respuesta normal de FSH, lo que hace determinar que el daño es hipotalámico.

Causas Testiculares

Los hombres con historia de maldescenso testicular uni o bilateral, esto es, con **criptorquidia** tienen pobre calidad del semen con un recuento bajo de espermatozoides y fertilidad alterada,^{78,173} asociada en ocasiones a otras alteraciones morfológicas del aparato genital masculino.^{57,83,84} La orquidopexia quirúrgica y hormonal son los métodos disponibles para el tratamiento del testículo anormalmente descendido. La corrección de la criptorquidia no garantiza la recuperación total de la fertilidad, ya que existen daños celulares importantes que dependen del tiempo de evolución de la criptorquidia.¹⁶⁵

La relación de la criptorquidia unilateral con las alteraciones del receptor de andrógenos constituyen en la actualidad motivo de controversia, debido a que mutaciones del gen del receptor de andrógenos no son observadas en la mayoría de los pacientes con criptorquidia unilateral.^{142,143,158} En un estudio reciente, se ha encontrado que el 63% de los pacientes con testículos localizados en el escroto tenían niveles altos del receptor de andrógenos, mientras que en el 85% de los pacientes con maldescenso testicular los niveles del receptor de andrógenos estaban disminuidos y, además, en los pacientes con testículos intraabdominales el receptor de andrógenos eran muy bajo, tal como ocurre en el síndrome de insensibilidad a

los andrógenos (síndrome de feminización testicular).^{34,143} Sin embargo, otros autores en pacientes con criptorquidia unilateral no encontraron anomalías del gen del receptor de andrógenos, por lo que no lo consideran como responsable directo del desarrollo de una criptorquidia aislada.¹⁴² En los testículos criptorquídicos puberales estudiados histológicamente, las células de Sertoli tipo adultas mostraban una inmunotinción para el receptor de andrógenos de intensidad moderada. Las células peritubulares de esos túbulos también expresaban el receptor de andrógenos con una intensidad similar. En contraste, la intensidad del inmunomarcaje del receptor de andrógenos fue menor en células de Sertoli inmaduras y disgenéticas. Finalmente, en la mayoría de los túbulos disgenéticos, la immunoexpresión del receptor de andrógenos no fue detectada en las células de Sertoli.¹⁴² Estos hallazgos pudieran sugerir que los segmentos de los túbulos seminíferos que contienen células de Sertoli de tipo adulto con receptor de andrógenos -positivo corresponden a zonas que facilitan la migración, diferenciación, y desarrollo de células germinales; por el contrario, aquellos segmentos del tubo seminífero con atrofia de células germinales muestran una disminución o ausencia de la expresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli disgenéticas.^{142,158} Los resultados presentados son consistentes con la interpretación de que la intensidad de la inmunotinción del receptor de andrógenos en las células de Sertoli disminuye de acuerdo a la gravedad de las lesiones desarrolladas en un testículo criptorquídico y, en definitiva, la ausencia focal de la expresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli se correlaciona con la carencia, focal o segmentaria, de la espermatogénesis en diferentes regiones de un mismo tubo seminífero.¹⁴² Algunos casos de pacientes adultos con testículos anormalmente descendidos presentan múltiples nódulos de células de Sertoli disgenéticas, llamados adenomas de células de Sertoli, mucho más frecuentes y de mayor tamaño en pacientes con síndrome de insensibilidad a los andrógenos.¹⁴³ En estos nódulos, algunas células de Sertoli inmaduras de núcleo redondo expresan, bien, una mínima tinción de receptor de andrógenos, o la ausencia del receptor de andrógenos. Respecto a las células de Leydig, en criptorquidia puberal la inmunotinción del receptor de andrógenos va desde una intensidad débil hasta la ausencia completa.¹⁴²

Los testículos criptorquídicos no presentan ningún tipo de lesión específica; incluso la lesión no es similar para los testículos de pacientes con la misma edad o para testículos localizados en el mismo nivel. No obstante, alguna relación si existe entre el diámetro tubular,

el índice de fertilidad tubular y el índice de células de Sertoli. Todos ellos permiten clasificar los testículos criptorquídicos, en uno de los siguientes tipos:¹²³

Criptorquidia Tipo I. Los testículos presentan mínimas alteraciones microscópicas, el tamaño testicular es normal o casi normal, el diámetro tubular medio está poco disminuido, el índice de células de Sertoli es normal, el 26% de los testículos tiene este tipo de lesión y el cirujano suele informar de testículos supraescrotales.

Criptorquidia Tipo II. Se caracteriza por lesiones de hipoplasia germinal, aparte de una moderada disminución en el diámetro tubular, este grupo de testículos tiene una marcada reducción en el número de células germinales.

Criptorquidia Tipo III. En los cuáles los testículos presentan hipoplasia tubular intensa (hipoplasia de células de Sertoli e hipoplasia germinal); representan el 33% de todas las criptorquidias y se localizan preferentemente en el canal inguinal

Criptorquidia Tipo IV testículos con hiperplasia difusa de las células de Sertoli, en su mayoría intraabdominales.

Las imágenes testiculares observadas en las biopsias prepuberales y postpuberales de estos pacientes permiten suponer la evolución siguiente:¹²³

En los casos con Criptorquidias tipo I, si estos testículos descienden tempranamente, la espermatogénesis se establece de forma completa, aunque el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas suele ser alto en el eyaculado. Los testículos pertenecientes a este grupo probablemente son portadores de lesiones secundarias a la temperatura y serían la única variante humana semejante a las criptorquidias experimentales.^{122,123}

En los pacientes con Criptorquidias tipo II: estos testículos probablemente son portadores de lesiones congénitas en mayor o menor grado. El estudio de biopsias postpuberales demuestra que los túbulos seminíferos se desarrollan normalmente, pero presentan células de Sertoli detenidas en su maduración o cuadros de hipoespermatoogénesis intensa, siendo muy escasos los espermatozoides formados.^{122,123}

En aquellos casos con Criptorquidia tipo III, después de la pubertad los testículos evolucionan postpuberalmente a túbulos seminíferos con solo células de Sertoli.^{122,123}

En las Criptorquidias tipo IV, el elevado número de células de Sertoli por sección tubular persiste después de la pubertad. Cuando están presentes las células germinales, no maduran más allá de espermátocitos de primer orden, dadas las dificultades que encuentran para nutrirse adecuadamente de las células de Sertoli con características inmaduras (aunque estas células pueden mostrar algún tipo de maduración).^{122,123} No obstante, más recientemente nos se considera este tipo IV de criptorquidia como un tipo independiente, antes bien, las lesiones de este tipo se incluyen en las propias de la criptorquidia tipo III.

Aunque el testículo contralateral aparece afectado hasta en el 75% de los casos de criptorquidia unilateral, con lesiones histológicas similares pero no tan intensas como las del testículo no descendido, no está indicada la biopsia sistemática transoperatoria de los testículos, ya que ello puede entrañar una necrosis de las células germinales más allá del corte de biopsia, así como originar la aparición de anticuerpos antitesticulares.^{122,123}

Para hacer una valoración morfológica del desarrollo de un testículo prepuberal, es necesario tener presente, al menos, los siguientes datos: edad, localización, tamaño del testículo y estado del epidídimo. La edad del niño condiciona la imagen testicular, ya que el testículo no es una estructura estática a lo largo de la infancia, sino que pasa por fases sucesivas de reposo y desarrollo hasta alcanzar la maduración en la pubertad; la fase de reposo se extiende desde la época neonatal hasta los cuatro años, caracterizándose por involución de todas las estructuras testiculares. De los 4 a los 9 años, la fase de desarrollo está precedida por un crecimiento tanto en longitud como en diámetro de los túbulos seminíferos y un aumento de las células germinales y una completa diferenciación y progresivo crecimiento prepuberal de la vía espermática intra y extratesticular.^{118,123}

De las dos funciones que tiene el testículo, la reproductiva puede ser valorada adecuadamente desde el punto de vista anatomopatológico, siendo ésta la referente al estado de los túbulos seminíferos; los parámetros anatomopatológicos que se usan son diámetro tubular, índice de fertilidad tubular e índice de células de Sertoli.¹²³ La otra función, la del intersticio (producción hormonal) se explora con mucha más facilidad desde el punto de vista endocrinológico, tanto estático como dinámico.

En el varón adulto, el **varicocele**, alteración del sistema venoso pampiniforme y menos frecuentemente del plexo cremastérico, se asocia directamente con diversos grados de

subfertilidad. Se asume que la prevalencia del varicocele es aproximadamente del 15–20 %, con respecto a toda la población masculina. La prevalencia de infertilidad en hombres con varicocele es mayor que en los hombres normales. El varicocele es el segundo hallazgo más frecuente como causa de infertilidad idiopática. Sin embargo, aun es incierto cual es la influencia de esta entidad en la infertilidad del varón. En hombres con varicocele se observan cambios importantes en la espermatogénesis y en los parámetros hormonales.¹²¹ Los cambios a nivel de espermograma de hombres con varicocele se caracterizan por oligozoospermia, asteno, teratozoospermia y la combinación de ellos. En algunos casos puede encontrarse azoospermia. En relación a los cambios hormonales, en algunos pacientes se observan niveles elevados de FSH, o una hiperrespuesta de FSH y LH a la estimulación con GnRh.

Los cuadros inflamatorios del testículo, las **orquitis**, son extremadamente raros y están asociados a cuadros inflamatorios del epidídimo. La orquitis viral es la más frecuente. El virus de la parotiditis, el Coxsackie, arbovirus tipo B, el virus herpes y el del dengue pueden causar daño a nivel testicular. Cuando la parotiditis ocurre después de la pubertad, el 25 % de los hombres afectados presenta daño testicular. El virus ocasiona daño irreversible de las células germinales, con compromiso de las células de Sertoli y de Leydig. Llevando a una atrofia testicular. La característica de estos testículos es la consistencia firme, y en el eyaculado hay oligoastenoteratozoospermia y en algunos casos azoospermia.^{121,122,124,181}

El **síndrome de solo células de Sertoli**, es una aplasia de células germinales en los túbulos seminíferos; puede ser una lesión congénita o adquirida^{3,120,126} y es un hallazgo bastante frecuente en los pacientes con cáncer testicular, los cuales tienen tubos seminíferos con un patrón de solo Sertoli en áreas adyacentes al tumor.¹²⁰ En estos pacientes, la medición del factor de células madre (SCF) y el c-kit mediante PCR en fracciones de células intersticiales y intratubular, son similares, a diferencia que en los individuos normales donde se observa una expresión mayor de SCF sobre el c-kit. Sin embargo en presencia de seminomas, la expresión de c-kit es mayor.³³ Las microdelecciones en el cromosoma Y representan una causa genética importante en este síndrome. Los individuos con esta patología cursan con azoospermia, pero con función endocrina conservada.^{62,100,122}

El **síndrome de Klinefelter** es una patología genética que se caracteriza por una aberración numérica congénita del cromosoma X. Es la causa más común de hipogonadismo masculino, el 50 % de estos pacientes no están diagnosticados clínicamente. Estos pacientes

cursan con grado variable de virilización, debido a que los niveles de andrógenos son normales inicialmente, pueden tener un pene de tamaño normal, sin embargo, los caracteres sexuales secundarios están disminuidos. A nivel testicular, existe una hialinización de los conductos seminíferos, lo que conlleva a un daño de las células germinales, lo que corresponde clínicamente con una azoospermia. Inicialmente en la enfermedad, existe una hiperplasia de células de Leydig, para compensar el déficit de andrógenos, pero posteriormente ocurre un daño testicular global que afecta también a estas células, conllevando un estado hipogonadal. El diagnóstico se corrobora por el cariotipo, el cual determina la presencia de un cromosoma X de más.^{4,27,126,183,184}

Anormalidades estructurales del cromosoma Y. Un cromosoma Y intacto es esencial para la formación y funcionamiento adecuado del tracto reproductor masculino.¹²² El gen SRY se localiza en el brazo corto del cromosoma Y y es determinante para la diferenciación sexual del varón. En otro sentido, el brazo largo del cromosoma Y presenta genes específicos que intervienen en la espermatogénesis. Tres regiones del brazo largo del cromosoma Y son esenciales para el desarrollo normal de la espermatogénesis. La pérdida de uno de estos locus, designados como factores azoospermicos (AZFa, AZFb, AZFc) causados por mutaciones espontáneas en la línea germinal paterna, conlleva un daño importante en la fertilidad, con afectación de la producción espermática que va desde oligozoospermia hasta la azoospermia. Las deleciones de las regiones son de dimensiones microscópicas y por tanto se dignan como microdeleciones del cromosoma Y. La prevalencia de la azoospermia es del 5 al 10%, y la de oligozoospermia grave, del 2 al 5%. La deleción de la región AZFc en la región distal Yq11 es la más frecuentemente observada, una región que contienen genes que se expresan en el testículo denominadas amplicones. Los amplicones están organizados en estructuras palindrómicas y frecuentemente tienen una estructura idéntica en un 99.9 %. La recombinación homóloga entre los amplicones frecuentemente causa deleciones y duplicaciones que explican el 12% de todas las azoospermias y el 6% de la oligozoospermia grave. Recientemente, se han descrito las deleciones más frecuentes del cromosoma Y, denominadas gr/gr, que afectan a la región AZFc del cromosoma Y y a dos formas del gen DAZ. Las deleciones de las copias del DAZ, tanto el DAZ1 como del DAZ2, han sido descritas como causa de afectación cuantitativa en la espermatogénesis.^{62,100}

La función hormonal de los pacientes con microdelecciones del cromosoma Y se encuentra dentro de la normalidad. La histopatología testicular varía desde un patrón de células de solo Sertoli focal o completo,¹²² en algunos casos existe una espermatogénesis cualitativamente efectiva pero con una afectación cuantitativa importante. Se requieren técnicas moleculares específicas para el diagnóstico.

Causas Post-Testiculares

Las causas post-testiculares corresponden a la patología de la vía espermática, de las vesículas seminales y de la próstata. Las **infecciones** de los diferentes segmentos de la vía espermática -conductos eferentes, conducto epididimario, conducto deferente y conducto eyaculador- pueden desencadenar una infertilidad masculina por diferentes mecanismos.¹²² El daño directo puede ser causado por microorganismos o por sus productos secretores,¹²⁴ mientras que la inflamación secundaria es producida por el número incrementado de leucocitos y secreciones incrementadas de interleukinas y radicales libres de oxígeno, los cuales pueden afectar directamente la capacitación espermática. Las infecciones pueden condicionar una obstrucción uni o bilateral de los conductos de la vía espermática, con formación de anticuerpos contra los espermatozoides y disfunción de la eyaculación. Las enfermedades clásicas como la blenorragia, puede conllevar a procesos obstructivos importantes de los conductos espermáticos con la consecuencia de azoospermia; otros gérmenes como *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma spp* y *Ureaplasma urealyticum* también como bacterias Gram negativas del tracto urogenital son microorganismos que pueden ocasionar infecciones de las vías espermáticas condicionando desde oligozoospermia hasta azoospermia en los casos de obstrucción.

Las **obstrucciones** de las diferentes regiones de la vía espermática pueden ocurrir a nivel de la *rete testis*, del conducto epididimario, del conducto deferente y de los conductos eyaculadores.¹²¹ Además de la aplasia congénita de los ductos deferentes y las obstrucciones bilaterales de los conductos eyaculadores, se describen enfermedades como el síndrome de Young, epididimitis agudas y crónicas o inflamaciones de la glándula prostática y las vesículas seminales. Las obstrucciones bilaterales completas de los conductos seminales conllevan azoospermia y por tanto infertilidad. Una obstrucción unilateral puede ser compensada completamente por el lado contralateral. Las obstrucciones parciales de ambos

lados, según el grado de obstrucción, puede ocasionar deterioro importante de los parámetros eyaculatorios con oligo-astenozoospermia grave.

La fibrosis quística es una de las enfermedades autosómicas recesivas más comunes, que afecta a 1 de cada 2500 niños. La paternidad y fertilidad de los pacientes con fibrosis quística se encuentra comprometida. La azoospermia obstructiva se encuentra en más del 95% de los hombres con esta enfermedad. La mayoría tienen oclusión congénita bilateral de las vasas deferentes o del epidídimo, sin embargo en algunos pacientes es difícil detectar el sitio de la obstrucción.

El Laboratorio en la Evaluación del Hombre Infértil

En la figura 1 se resumen los objetivos de la evaluación del hombre infértil.

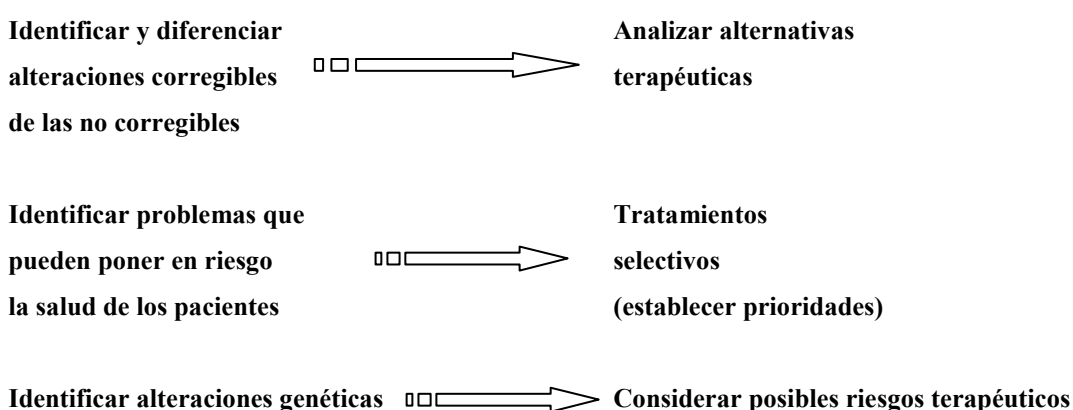


Figura 1. Objetivos de la Evaluación del Hombre Infértil

Análisis del Semen

Se debe realizar por lo menos un espermiograma para iniciar la evaluación del hombre infértil; cuando surgen dudas sobre condiciones y método de recolección de la muestra o cuando no hay concordancia entre las diferentes variables del líquido seminal, se deben analizar dos especímenes. El paciente debe ser instruido verbalmente y por escrito sobre la obtención y recolección de la muestra de semen. El análisis del líquido seminal lo llevamos a cabo siguiendo las recomendaciones del Manual de la Organización Mundial de la Salud.¹⁸¹

Todas las variables del líquido seminal son importantes: su aspecto, color, volumen, pH, celularidad, viscosidad, agregados espermáticos, concentración espermática, movilidad y morfología de los espermios. Se realizarán pruebas especiales (opcionales) para evaluar la función espermática. Pruebas inmunológicas básicas y métodos para detectar exceso de leucocitos y descartar infección de las vías seminales. La leucocitoespermia ($>1 \times 10^6/\text{ml}$) es sugestiva de infección de las vías urogenitales, más aún cuando el pH es mayor de 8,¹⁸¹ lo cual obliga a realizar el estudio bacteriológico del líquido seminal.

Un espécimen de semen normal es suficiente para iniciar la evaluación. Sin embargo, otros factores deben ser considerados, tales como la función sexual, las técnicas sexuales y el componente inmunológico, por mencionar algunos de ellos. Uno de los aspectos más controversiales sobre las variables del líquido seminal, es el relacionado con la morfología espermática. Guzick et al.⁸⁴ evaluaron dos especímenes de semen en 765 parejas infértiles y 696 parejas fértiles, tratando de establecer cuál de las variables: concentración, movilidad y morfología de los espermios, podía discriminar entre hombres fértiles e infértiles. Se establecieron rangos para la subfertilidad y para la fertilidad; los valores entre esos rangos fueron considerados como indicadores de infertilidad no precisada o indeterminada; los autores encontraron superposición de los valores entre los hombres fértiles y los infértiles dentro de los rangos establecidos para las tres variables; aun cuando cada una ayudó a distinguir los hombres fértiles de los infértiles, ninguna tuvo poder discriminatorio definitivo. El porcentaje de espermatozoides con morfología normal de acuerdo con el criterio estricto de Kruger et al.¹⁰¹ fue el que mejor diferenció los grupos. Los investigadores recomiendan cautela al interpretar valores dentro del rango subfétil o indeterminado, puesto que no excluyen la posibilidad de fertilidad normal.

Diferentes estudios en las últimas décadas se refieren a la declinación de la salud reproductiva en los humanos, expresadas con una creciente prevalencia de criptorquidia e hipospadias, declinación de la calidad del semen, aumento de la incidencia del cáncer de testículo y aumento en la demanda de programas de reproducción asistida.^{19,43,101} Las patologías mencionadas guardan relación entre sí y se ha postulado su vinculación con la *disgenesia testicular*, provocada por factores ambientales que actuarían en la vida fetal. Son múltiples los contaminantes ambientales estudiados bajo la denominación de disruptores

endocrinos, entre ellos los estrógenos ambientales (xenoestrógenos)^{55,147} y otros contaminantes como los agropesticidas.⁴²

La **leucocitoespermia** es otro aspecto importante en relación con la calidad del semen.¹⁶³ El exceso de leucocitos peroxidasa positivos en el semen ($>10^6/\text{ml}$) son una fuente generadora de especies reactivas de oxígeno (EROs o ROS), las cuales alteran el metabolismo, la movilidad y la capacidad fertilizante de los espermatozoides.^{74,162} Se ha comprobado que las EROs alteran la integridad del ADN de los espermios de hombres infértiles.^{8,61,159} En un estudio reciente Saleh et al.¹⁴⁸ demostraron que la leucocitoespermia está asociada con la capacidad aumentada del espermatozoide para la producción espontánea e inducida de EROs, creando riesgos de estrés oxidativo mediado por los leucocitos.¹⁴⁸ La leucocitoespermia además está asociada con infecciones del tracto urogenital, factor importante de infertilidad en el varón. Uno de los efectos de la infección de las glándulas accesorias genitales es la oligo/astenozoospermia; además, gérmenes como la *Chlamydia tracomatis*, con una fuerte capacidad inmunogénica pueden crear condiciones para las alteraciones inmunológicas del sistema endocrino-reproductor masculino.^{131,172}

La **oligozoospermia** obliga a descartar la existencia de varicocele o alteraciones primarias del testículo. En el caso de azoospermia, se deben diferenciar las causas obstructivas de las no obstructivas (daño testicular). La azoospermia debe ser diagnosticada cuando se comprueba que no hay espermatozoides en el residuo “pellet” en el tubo de ensayo después de centrifugar el líquido seminal.¹⁸⁷ Tanto en la oligozoospermia ($<10^6/\text{ml}$) como en la azoospermia el volumen testicular es orientador sobre problemas primarios o secundarios, en ambos casos se debe realizar la investigación endocrino-hormonal. Los pacientes con daño testicular primario usualmente presentan disminución del volumen testicular bilateral ($<10\text{-}12\text{ml}$); el volumen del eyaculado es normal pero la FSH está anormalmente elevada. Mientras que el volumen testicular y los niveles de FSH son normales en los pacientes con azoospermia obstructiva. Además, la disminución del eyaculado ($<1\text{ ml}$), la falta de coagulación y un pH ácido son característicos de la agenesia congénita de los deferentes y de las vesículas seminales. Otros marcadores de las glándulas accesorias como la fructosa y la α -glucosidasa, ponen en evidencia la alteración de las vesículas seminales y del epidídimo respectivamente.⁴⁹

Evaluación Endocrina: Estudios Hormonales

Se ha estimado que las alteraciones hormonales son responsables solamente del 3% de los casos de infertilidad en el varón.^{57,66} Sin embargo, después de la evaluación clínica y con el resultado del espermiograma, el especialista debe tomar la decisión sobre la conveniencia de realizar estudios especiales. La evaluación endocrina está indicada en pacientes con oligozoospermia ($<10^6/\text{ml}$) o en azoospermicos, más aún si éstos presentan disfunción sexual.

La evaluación inicial incluye la medida de FSH (hormona folículoestimulante) y testosterona total. Niveles anormalmente bajos de testosterona obligan a repetirla y medir testosterona libre junto con hormona luteinizante (LH) y prolactina (Prl).⁴⁴ Un hombre infértil con disminución del volumen testicular ($<12 \text{ ml}$) y niveles anormalmente elevados de FSH indica una alteración de la espermatogénesis. Mientras que niveles plasmáticos anormalmente bajos de gonadotropinas sugieren la existencia de una lesión a nivel central (hipotálamo-hipofisaria); en este caso, se debe medir la prolactina plasmática para descartar estados hiperprolactinémicos y la existencia de un tumor hipofisario (prolactinoma).^{44,113} Cuando los niveles de las gonadotropinas LH y FSH están dentro del rango normal, se deben medir los niveles de testosterona total y libre para estudiar relaciones hormonales que permitan descartar alteraciones a nivel de receptor androgénico.^{26,44,113} En hombres obesos infértiles, se debe realizar un estudio endocrino- metabólico: prueba de tolerancia a la glucosa con respuesta de insulina, leptina y lipidograma, midiendo además los niveles plasmáticos de testosterona total y estradiol.⁸⁶

Otros estudios, como el inmunológico deben realizarse después de descartar las alteraciones más frecuentes, de acuerdo a lo señalado en la Tabla 1. La prueba post-coital es muy orientadora en relación con posible factor inmunológico. El estudio genético (citogenético) -análisis cromosómico- debe realizarse en la pareja con el antecedente de pérdidas fetales recurrentes en el primer trimestre de la gestación o en el hombre con manifestaciones fenotípicas sugestivas de disgenesia testicular. Estudios especiales para evaluar la capacidad funcional del espermatozoide, como fragmentación o dispersión de la cromatina,⁶⁴ deben realizarse siguiendo protocolos especiales y particularmente cuando se recurre a técnicas de reproducción asistida.^{64,69}

La **inhibina** es un péptido hormonal que ejerce un efecto de regulación de la secreción y producción de FSH en la hipófisis; principalmente, existe en dos formas bioactivas: el dímero A, que está constituida de una subunidad alfa y una subunidad beta-A, y el dímero B, que está formado por una subunidad alfa y una subunidad beta-B.⁵⁸ Las subunidades están ligadas covalentemente por un puente disulfuro. La implementación de un formato de inmunoanálisis, que hace posible la medición de las dos formas de inhibina bioactivas disponibles, ha mostrado que la inhibina B es la forma de inhibina bioactiva principal circulante en el hombre.^{72,91} Los estudios in vitro parecen indicar que la inhibina es producida principalmente en la célula de Sertoli del testículo,^{81,154,156,170} y la localización de la subunidad peptídica de inhibina y el ácido ribonucleico mensajero para su síntesis ha sido marcado por inmunohistoquímica e hibridación in vitro, a nivel de tejido testicular en ratas,^{105,111,146} primates¹⁹¹ y en humanos.^{105,111,146} Sin embargo, la regulación de la secreción de inhibina se mantiene desconocida. Los estudios sobre la función de las gonadotropinas o los andrógenos en la regulación de la inhibina son contradictorios. Algunos estudios indican que la presencia de tipos de células germinales específicas pueden estimular la producción y secreción de la inhibina como se muestra en las ratas^{7,32,95,96,134} y en hombre con espermatogénesis alterada, quienes tienen generalmente niveles muy bajos o indetectables de inhibina B.¹⁰

La **inhibina/activina** fueron inicialmente reconocidas como hormonas gonadales que regulan la producción y liberación de FSH desde la hipófisis anterior en un efecto de asa de feedback.^{41,157} Estudios muestran que la inhibina está compuesta de un dímero de una subunidad común alfa y otra específica para cada una beta-A (inhibina A) o beta-B (inhibina B) mientras la activina son dímeros de unidad b /activina A, activina B, y activina AB). Esas proteínas, las cuales son miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF beta), son producidas en el testículo y se considera que tienen actividades autocrinas y paracrinas en la regulación de la esteroidogénesis testicular y la espermatogénesis.^{107,157} El desarrollo de inmunoanálisis específicos para las formas dímeras ha permitido la demostración de que la inhibina B es la forma circulante producida en el hombre a nivel de la vida fetal y adulta.^{17,21,98,175} A nivel de la pubertad, las células de Sertoli parecen ser la fuente celular más probable de la producción de inhibina B. Mientras que después de la pubertad, los niveles séricos de inhibina B están estrechamente relacionadas con el estado de la espermatogénesis, como se muestra por la correlación entre los niveles séricos de inhibina B y el recuento espermático.¹³³ Con todo, en el hombre adulto, la localización

subcelular de la producción intratesticular, tanto de la subunidad alfa como de la beta-B de inhibina es aún motivo de controversia.⁹⁴

Los patrones de localización de las proteínas inmunorreactivas de inhibina/activina - subunidades α , βA y βB - han sido examinados en testículos humanos de fetos y adultos. En el testículo de fetos humanos, las subunidades α y βB , pero no la βA , son inmunolocalizadas en las células de Sertoli y de Leydig.¹³⁸ El ARNm de la subunidad α está presente en las células de Sertoli y en las células intersticiales.¹⁴⁵ En testículos adultos normales, la inmunocoloración de la subunidad α está presente tanto en las células de Sertoli como en las células de Leydig³¹ y la subunidad βA está localizada similarmente en ambas células.¹⁷⁴

Anderson et al.¹¹ mostraron una inmunoactividad específica para ambas unidades α y βB en las células de Sertoli y las células de Leydig; además este mismo grupo de investigadores.^{13,14} obtuvieron también en testículos de adultos una inmunocoloración positiva para la subunidad α de inhibina, tanto en las células de Sertoli como en las de Leydig. Asimismo estos autores, usando dos anticuerpos monoclonales diferentes para la subunidad anti- βB , observaron una inmunocoloración intensa en células germinales desde los espermatocitos en paquiteno a espermátidas redondas. No se observó coloración para la subunidad βB en las células de Sertoli, ni en espermatogonias, pero sí se expresa en espermatocitos preleptoteno, leptoteno o zigoteno, así como en espermátidas inmaduras. Sin embargo, las células de Leydig fueron también positivas para la inmunocoloración de subunidad βB . Así, mientras parece estar claro que la subunidad α está contenida en las células de Sertoli, la subunidad βB está presente en las células de Sertoli y en los espermatocitos. La distribución del ARNm para la subunidad inhibina/activina (α , βA y βB) en el testículo humano adulto no ha sido descrita hasta ahora.

El sitio de dimerización de la subunidades de inhibina se desconoce. No obstante, en testículos humanos y mediante microscopía electrónica, se ha evidenciado la transferencia de la subunidad α de inhibina desde las células de Sertoli a los espermatocitos.⁶⁷ Sin embargo, aunque la dimerización de la subunidad de inhibina puede tener lugar intracelularmente en el espermatocito, ésta puede también teóricamente llevarse a cabo extracelularmente. La creación de un puente disulfuro desde los grupos sulfidrilo de dos residuos de cisteína es una reacción pasiva que no requiere energía y que puede llevarse a cabo en un ambiente no reducido, tal como en el retículo endoplasmático, complejo de Golgi, y en vesículas del trans

del complejo de Golgi. Gray y Mason⁷⁹ han demostrado que la secuencia propeptídica presente en los precursores de la subunidad b es necesaria para la dimerización, presumiblemente por proveer la configuración propia para la exposición de los residuos de cisteína.^{79,106} Mostrando que la secuencias de propéptidos presentes en la subunidad b son necesarias.

Mientras los niveles de inhibina B sérica en jóvenes prepuberales son independientes de la presencia de células germinales, los niveles de inhibina b sérica en hombres postpuberales están estrechamente relacionados con la presencia de células germinales desde la diferenciación de espermátocitos paquitenos a espermátidas tempranas. En la rata, la producción de inhibina ha estado correlacionada con la presencia de ciertos tipos celulares germinales,^{18,82,90,97} aunque en esta especie la producción de inhibina, medida en un ensayo de subunidad alfa, estuvo más alta en presencia de espermátidas tardías.

Los niveles séricos de inhibina B están temporalmente elevados después del nacimiento, presumiblemente como consecuencia de la activación temporal de la hipófisis que ocurre en esta primera fase de vida postnatal después del nacimiento,⁷⁵ indicando que la secreción de inhibina B en el recién nacido está bajo la influencia de las gonadotropinas. Más tarde, en niños, los niveles de gonadotropinas son bajos, pero quizá suficientes para sostener los niveles séricos de inhibina B observados durante la infancia.¹² En los hombres adultos, los niveles séricos de inhibina B en pacientes hipogonadotrópicos están en el rango más bajo de los hombres normales,¹⁴⁰ aunque esto puede ser debido a un número reducido de células de Sertoli más que a una disminución de la producción de inhibina B causado por niveles bajos de FSH. Estudios que han comparado la intensidad de la coloración expresada por la subunidad bB demuestran que en el testículo del adulto la coloración del testículo prepuberal estuvo relativamente débil. Esto se observa también en el testículo de un niño de 4,5 meses de edad, aunque esta es una edad donde se sabe que los niveles séricos de inhibina son más altos que los del adulto.¹⁵ Estas observaciones y otras han llevado a la idea de que el número de células germinales en el adulto está relacionado directamente con el número de células de Sertoli funcionales.¹⁵¹

En humanos, sólo cerca del 10% de los 4 billones de células de Sertoli están presentes ya desde el nacimiento.⁵⁰ Estudios controlados en primates no humanos revelan que el número de células de Sertoli se incrementa entre el período neonatal y la juventud, con un

aumento en la pubertad.¹⁵³ Ambos incrementos en el número de células de Sertoli, tanto en la vida neonatal como en la pubertad, son paralelos a una elevación de los niveles circulantes de inhibina B,^{109,185} tal como se ha demostrado en monos Rhesus normales, en los que la inhibina B muestra una fuerte correlación positiva con el número de células de Sertoli.¹⁴¹

RECEPTOR DE ANDRÓGENOS: SU PARTICIPACIÓN EN LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL TESTÍCULO NORMAL Y PATOLÓGICO

La síntesis de inhibina B por las células de Sertoli y sus mecanismos de secreción están regulados por el receptor de andrógenos (RA) el cual también participa directamente en las regulaciones paracrinas que los andrógenos secretados por las células de Leydig ejercen sobre la función de las células de Sertoli –fundamentalmente en las diferentes rutas de señalización celular, las cuales regulan también el ciclo celular de la espermatogénesis y la espermiogénesis. En el testículo humano, la inmunoexpresión del RA se observa en las células de Sertoli, células mioides peritubulares,¹⁹⁰ células de Leydig, y células periarteriolas; contrariamente, no existe inmunomarcaje para el RA en los diferentes tipos de células germinales.^{158,169} Recientemente, el estudio del RA ha adquirido singular importancia, sobretudo en pacientes con cáncer de próstata, ya que se han detectado algunas mutaciones en una proporción pequeña de estos pacientes.^{68,117} Sin embargo, niveles de inmunoexpresión de proteínas del RA son similares en tumores prostáticos dependientes de andrógenos,^{35,59} además, algunos genes que regulan el RA se expresan anómalamente en el cáncer de próstata,⁵⁹ lo que sugiere que el RA tiene un rol en el crecimiento del cáncer de próstata en la ausencia de andrógenos testiculares.^{35,59,68} Mutaciones del RA también se han asociado con defectos en la virilización. En este sentido, diferentes tipos de mutaciones se han detectado en el gen del RA en individuos con síndrome de insensibilidad a los andrógenos^{39,137} (androgen insensitivity syndrome, AIS). Sin embargo, el significado de la expresión del RA en la patología testicular funcional congénita y adquirida del testículo humano no está aún bien establecido.

Se sabe que el RA pertenece a una subfamilia de la gran familia de factores de transcripción nuclear que incluyen el receptor de estrógenos (RE alfa y RE beta), el receptor de hormonas tiroideas (RT), el receptor de la vitamina D y el receptor del ácido retinoico.¹³⁷ La unión de los andrógenos a su receptor induce un cambio estructural en el RA que convierte al receptor de un estado inactivo a su forma activa.

El gen para la síntesis del RA fue secuenciado en el brazo largo del cromosoma X (Xq 11-12).⁴⁰ La estructura de RA está organizada en dominios funcionales, que consisten en un dominio N-terminal (NTD), codificado por el exón 1; un dominio de ADN (ODBC), codificado por los exones 2 y 3; y un dominio de enlace ligando C-terminal (LBD), que está codificada por los últimos cinco exones. Existe también una región pequeña de bisagra entre ODBC y LBD. Considerando que el ODBC y la LBD del RA son altamente específicos entre las especies, el NTD muestra más variabilidad de secuencia, lo que es importante para las diferencias en el control homeostático y la complejidad de señalización del RA.^{70,130,142} El NTD RA es relativamente largo, lo que representa casi la mitad de la codificación de la secuencia del receptor; contiene el dominio de función de transactivación principal del RA, llamado función de activación 1 (Arizona), que es responsable de casi todas las actividades transcripcionales del RA. Mutagénesis y estudios de eliminación han indicado que cuando falta el RA o la LBD está truncada, el Arizona se vuelve transcripcionalmente activo. Además, Arizona media en las interacciones con corre reguladores transcripcionales y miembros de la maquinaria transcripcional basal.¹³⁰ El ODBC es un dominio rico en cisteína, es la región más conservada dentro de la familia de receptores nucleares, con una secuencia de aminoácidos idéntica en la rata y en los humanos. Este dominio contiene dos dedos de zinc y una extensión de C-terminal. El primer dedo de zinc media el reconocimiento específico de ADN, y el segundo está involucrado en la homodimerización y la estabilización del complejo ADN/receptor. La región C-terminal del ODBC y la región de bisagra contienen señales dependientes del ligando de localización nuclear bipartito (NLS), que indica el papel de estas regiones en la translocación del RA al núcleo de la célula. Existen genes y cofactores que intervienen en el funcionamiento adecuado y en la modulación permisiva del receptor de andrógenos, el ARA54, ARA 55 y ARR19, entre otros, y se ha determinado que cumplen un efecto importante en la activación de este receptor.^{20,88,103,136}

En el tracto reproductivo masculino, la inmunolocalización del RA ha sido observada constantemente en el núcleo de las siguientes células: 1) en el testículo: células de Sertoli, células de Leydig, células mioideas peritubulares,¹⁹⁰ epitelio de la *rete testis* y epitelio de los conductos rectos; 2) en el epidídimo: células ciliadas y principales de los conductos eferentes, en las células principales, basales y apicales del conducto epididimario; 3) en el conducto deferente: células oscuras y apicales estrechas; 4) en la próstata y vesículas germinales: células basales (de reserva) y principales (secretoras). Además, se ha observado RA en todas

las células musculares lisas, células endoteliales, y fibroblastos presentes en el testículo y en las vías espermáticas, aunque la intensidad de inmunomarcaje intranuclear de RA es solo moderada.

ALTERACIONES DE LA EXPRESIÓN DEL RA EN PATOLOGÍA TESTICULAR

Algunas mutaciones del RA se pueden encontrar en casos con criptorquidia bilateral asociadas a AIS. Sin embargo, la relación de la criptorquidia unilateral con las alteraciones del RA constituye en la actualidad motivo de controversia, debido a que mutaciones del gen de RA no son observadas en la mayoría de los pacientes con criptorquidia unilateral.¹⁸²

Las mutaciones del gen para el RA condicionan diferentes manifestaciones clínicas.¹³⁷ Estas mutaciones pueden encontrarse en individuos adultos con hipogonadismos primario, e, incluso, en adultos ancianos con hipogonadismo secundario al normal declinar testicular con la edad; pero es, sin duda, la población pediátrica en la que más frecuentemente se encuentran alteraciones moleculares e inmunohistoquímicas del RA;⁵⁴ siendo posible que estas alteraciones tengan relación con la involución de las células de Leydig en la senectud.¹⁹³ La resistencia en los órganos finales al RA ha sido designada con el nombre de AIS. El AIS sigue un patrón de herencia ligado al cromosoma X, por cada madre portadora, hay aproximadamente 1,2 niños con cariotipo 46 XY que está afectado y 1,2 niñas portadoras. La incidencia de este síndrome es de 1:20.400 recién nacidos.²² En la mayoría de los pacientes con AIS, los testículos se encuentran alojados en la cavidad abdominal y menos frecuentemente en el conducto inguinal;²⁴ además, en la infancia el AIS suele descubrirse durante la exploración de una hernia inguinal.²² En pacientes fenotípicamente niñas postpuberales, la causa más frecuente de consulta es la amenorrea primaria. Adicionalmente, en algunos individuos con AIS y criptorquidia, la persistencia parcial del conducto de Müller revela una relación estrecha entre la actividad del RA y la acción de la hormona antimülleriana (AMH). El efecto de la AMH en mediar la regresión del conducto de Müller puede requerir interacción sinérgica con el RA.¹³⁷

Se han descrito dos formas clínicas de AIS: síndrome de sensibilidad a los andrógenos completo (CAIS) y el síndrome de insensibilidad a los andrógenos incompleto (IAIS).^{39,137} En el CAIS, el fenotipo característico consiste en la presencia de genitales externos femeninos, una vagina corta y frecuentemente hendida, ausencia o hipoplasia de estructuras derivadas del

conducto mülleriano (útero y trompas) y del conducto de Wolf (vía espermática), ausencia de próstata, desarrollo de tejido mamario y ausencia de pelos axilares y pubianos.³⁹ El estudio histológico de las gónadas de estos pacientes con CAIS demuestran cambios semejantes en testículos criptorquídicos, aunque en algunos casos las lesiones suelen ser menores e incluso no diferir en los primeros estadios evolutivos de la histología del testículo de un niño normal.⁹ Los adenomas de células de Sertoli son frecuentes en los testículos de estos pacientes. En el IAIS, los cambios fenotípicos son muy diversos, aunque en la mayoría de estos pacientes predomina la apariencia femenina con genitales ambiguos, mientras que en otros casos existe un predominio del fenotipo masculino y cuando llega la pubertad a estos pacientes se produce también una elevación de los niveles séricos de testosterona, LH y estradiol.³⁹ Se ha realizado un estudio de mutaciones en una serie de 102 pacientes con AIS y se ha relacionado el tipo de mutación encontrada con la localización del testículo criptorquídico, aunque los datos obtenidos han sido poco relevantes. Así mismo en este estudio se ha visto que testículos abdominales se encontraron en el 52% de CAIS, pero solo en el 3% de IAIS, y que el 82% de pacientes con fenotipo femenino tenían los testículos en la cavidad abdominal.²⁴ Todos estos datos han permitido concluir que la posición testicular se correlacionó con el fenotipo de los genitales externos en los pacientes que tienen mutación del RA, lo que ha permitido sugerir una posible participación en el descenso testicular de mecanismos que regulan el RA.

En definitiva, en el testículo del hombre adulto, la inmunoexpresión del RA es detectada exclusivamente en el núcleo de células de Sertoli, células de Leydig y células mioides peritubulares. La función de estas células está estrechamente relacionada con la concentración y expresión del RA. La inmunolocalización del RA citoplasmática no se ha observado en estructuras testiculares humanas. Mutaciones en el RA condicionan alteraciones en la acción de los andrógenos, afectando la función endocrina a nivel testicular y de otros órganos diana, comprometiendo además la función reproductiva. Algunas mutaciones del RA están implicadas en casos con testículos criptorquídicos. La relación de las alteraciones del RA con el desarrollo de un testículo no descendido unilateralmente es aún motivo de controversia, debido a que mutaciones del gen de RA no son observadas en la mayoría de los pacientes con criptorquidia unilateral. El AIS es la manifestación clínica más evidente de mutaciones en el RA. Las mutaciones más frecuentemente observadas consisten en lesiones puntuales en cambios de secuencias de aminoácidos, delección de nucleótidos o delección parcial o completa del gen. Su forma completa (CAIS) se presenta fenotípicamente como sexo femenino. En el

AIS existe una considerable heterogeneidad en la expresión del RA que depende de la penetrancia de la mutación. En hombres infértiles no se han encontrado cambios evidentes de inmunoexpresión del RA que lo conviertan en un marcador de función testicular, y todavía es prematuro en patología reproductiva humana predecir el grado de hipoespermatogénesis o el grado de desdiferenciación de las células de Sertoli solo teniendo en cuenta las alteraciones de expresión génica e histopatológica del RA, dado que hasta la actualidad el grado de expresión del RA no se relaciona con las alteraciones de diferenciación del epitelio espermático presentes en los pacientes subfértiles.

La finalidad de la presente Tesis Doctoral es evaluar las alteraciones morfológicas y funcionales de las células de Sertoli humanas, de una parte en relación con la edad, sobre todo en testículos de individuos ancianos, y correlacionarla con la hipoespermatogénesis que presentan los tubos seminíferos de estos sujetos de edad avanzada. Para ello se utilizan los dos marcadores inmunohistoquímicos que mejor predicen el estado funcional de las células de Sertoli, como son la expresión intracitoplásmica de Inhibina B, -la cual se correlaciona con los mecanismos de señalización y de secreción de proteínas de las células de Sertoli que regulan la espermatogénesis- y también la cuantificación inmunohistoquímica de la expresión intranuclear del RA, el cual activa las rutas de señalización y secreción de las células de Sertoli mediada por andrógenos. De este modo, se podrá dilucidar si estos cambios de las células de Sertoli son secundarios a la hipoandrogenización que experimentan este grupo poblacional de sujetos ancianos. De otra parte, en este estudio también se incluyen casos de criptorquidia, con el fin de precisar los mecanismos de las posibles alteraciones funcionales de las células de Sertoli, y si estas alteraciones tienen un distinto comportamiento en aquéllos tubos seminíferos del testículo criptorquídico que han experimentado el crecimiento postpuberal, con respecto a aquéllos tubos malformados y con lesiones disgenéticas profundas. De este modo se pretende dilucidar si las lesiones disgenéticas tubulares son alteraciones primarias, las cuales pudieran producirse muy tempranamente, incluso desde los primeros estadios del desarrollo fetal de las células de Sertoli.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

¿Existen cambios de la inmunoeexpresión de Inhibina B y del Receptor de Andrógenos (RA) en relación con el estadio madurativo del epitelio germinal en testículo de hombres jóvenes y ancianos y en pacientes pre y postpuberales con criptorquidia?

OBJETIVOS

Primero. Evolución inmunohistoquímica y microdensitométrica de la expresión de Inhibina B y del RA de las células de Sertoli en relación con los diferentes estadios madurativos del epitelio germinal del hombre adulto normal.

Segundo. Evolución inmunohistoquímica y microdensitométrica de la expresión de Inhibina B y del RA de las células de Sertoli en relación con la atrofia de los tubos seminíferos durante la senectud.

Tercero. Evolución inmunohistoquímica y microdensitométrica de la expresión de Inhibina B y del RA de las células de Sertoli en relación con los diferentes tipos de disgenesia testicular, presentes en testículos criptorquídicos de pacientes infantiles y postpuberales.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

En este estudio se pretende evaluar la expresión de Inhibina B y del Receptor de Andrógenos (RA) en las células de Sertoli, utilizando tejidos histológicos previamente fijados en formol e incluidos en parafina, procedentes del archivo de la Unidad de Histología de la UAM y del Hospital Universitario La Paz de Madrid (UAM). Se van a seleccionar casos de diferentes edades, tanto normales como patológicos. El presente estudio se centra en los posibles cambios inmunohistoquímicos que puede experimentar la Inhibina B y el RA en la involución del testículo con la edad en los hombre ancianos y en la las diferentes lesiones de disgenesia testicular que se observan en los testículo criptorquídicos extirpados durante la infancia o después de la pubertad. En la presente Tesis Doctoral se han estructurado los siguientes grupos de estudio:

GRUPOS DE ESTUDIO

Grupo I. Testículos humanos normales infantiles para el estudio comparativo de la expresión de Inhibina B y del RA.

Se utilizaron 5 testículos y 1 de epidídimo, obtenidos durante la autopsia de niños fallecidos por diferentes causas, pero sin alteración de los órganos genitales. Edad promedio 3,1 años.

Grupo II. Testículos humanos durante el periodo puberal normal, para el estudio comparativo de la expresión de Inhibina B y del RA.

Se utilizaron 5 testículos procedentes de igual número de autopsias de niños fallecidos por causas que no comprometían lesiones de las gónadas. Edad promedio 10,8 años.

Grupo III. Testículos humanos normales de hombres adultos, para el control del estudio de la inmunoexpresión de Inhibina B y del RA en las células de Sertoli.

Se utilizaron 8 testículos normales, procedentes de igual número de autopsias de hombres adultos, fallecidos por diversas causas, pero sin patologías primarias o secundarias del aparato genital. Edad promedio 51,9 años.

Grupo IV. Testículos de hombres de edad avanzada, para valorar la inmunoexpresión de Inhibina B y del RA, en relación con las lesiones del epitelio seminífero.

Se utilizaron 14 testículos normales de igual número de pacientes ancianos, procedentes 9 casos del archivo de biopsias y autopsias del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de La Paz de Madrid (Edad promedio 73,5 años), y 5 testículos procedentes del archivo de biopsias y autopsias del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Guadalajara (Edad promedio 70,2 años).

Grupo V. Testículos criptorquídicos humanos de pacientes postpuberales, para el estudio de Inhibina B y del RA.

Se utilizaron los testículos extirpados en 17 pacientes con criptorquidia unilateral; las orquiectomías se realizaron en los servicios de urología de los Hospitales La Paz y de Guadalajara (Edad promedio 19,7 años).

Grupo VI. Testículos criptorquídicos humanos de niños prepuberales, para el estudio de Inhibina B y del RA.

Se utilizaron los testículos extirpados en 9 pacientes con criptorquidia unilateral; las orquiectomías se realizaron en los servicios de urología de los Hospitales La Paz y de Guadalajara (Edad promedio 5,7 años).

MÉTODOS

Métodos de Estudio Histológico General

Fijación de las Piezas

La mayoría de las piezas de orquiectomía se fijaron por inmersión en formol neutro taponado al 4%, durante 72 horas, pero algunas piezas quirúrgicas y las correspondientes a las biopsias del grupo control se fijaron en líquido de Bouin, fijador habitual de conservación de todas las biopsias testiculares obtenidas en niños y en pacientes adultos para la evaluación diagnóstica y pronóstica de la fertilidad.

Formol tamponado:

Fosfato monosódico, monohidrato	4.00 g
Fosfato disódico anhidro	6.50 g
Agua destilada	900 ml
Formol puro (CH ₂ O 40%)	100 ml

Líquido de Bouin:

Ácido pícrico a saturación en agua destilada	750 ml
Formol puro (40%)	250 ml
Ácido acético glacial	50 ml

Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas

Las piezas de orquiectomía y de autopsia fueron seccionadas en cortes perpendiculares a todo lo largo del eje mayor del testículo, con un espesor de cada sección macroscópica de alrededor de 3 mm. A continuación, se procedió a la inclusión en parafina, bien de toda la pieza en los casos pediátricos, o bien de secciones seleccionadas al azar (siempre en número superior a 6 cortes por testículo) en las piezas extirpadas en pacientes adultos. De otra parte, las biopsias testiculares fueron incluidas in toto, debido a su pequeño tamaño. Todas estas piezas fueron incluidas en parafina en el procesador de tejidos marca Autotechnicon Duo®, lo que permitió realizar la deshidratación de las secciones fijadas mediante pases consecutivos en alcohol de concentraciones crecientes (70%, 96% y alcohol absoluto) y aclarado posterior en acetato de butilo, dando dos pases de una hora cada uno. Finalmente, las secciones tisulares se incluyeron en parafina líquida (punto de fusión 60° C) durante dos horas.

Una vez realizados los bloques de parafina, se obtuvieron 5 cortes seriados de 5 µm de espesor, mediante un microtomo de la marca Ernst Leitz GMBH (Typ 1212) Wetzlar Germany®, y las secciones se desparafinaron en xilol, se hidrataron en alcoholes de concentraciones decrecientes y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE), PAS (ácido peryódico y reactivo de Schiff, con y sin digestión por la diastasa), tricrómico de Masson y técnica de fibras elásticas con coloración de van Giesen (EVG), siguiendo los métodos histológicos habituales. Las preparaciones de HE recién teñidas se aclararon en agua destilada. Como método de montaje para todas las técnicas histológicas se utilizó la resina sintética DePex (Probus, Badalona).

Método Inmunohistoquímico para la Detección de Inhibina B

Se ha utilizado el método inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa para evaluar la expresión de Inhibina B y del Receptor de Andrógenos (RA) en los diferentes grupos control y de patologías testiculares estudiadas, mediante los anticuerpos monoclonales anti-Inhibina B (Dako, Glostrup, Denmark), diluido habitualmente a 1:500 y anti-RA (Dako, Glostrup, Denmark), diluido habitualmente a 1:500.

Para realizar el método inmunohistoquímico de detección de la expresión de Inhibina B, se obtuvieron cortes de 5 μ m de grosor del material incluido en parafina y se colocaron en portaobjetos tratados previamente con L-polilisina (Sigma, St Louis) durante 24 horas, con el fin de adherir mejor el corte al portaobjetos.

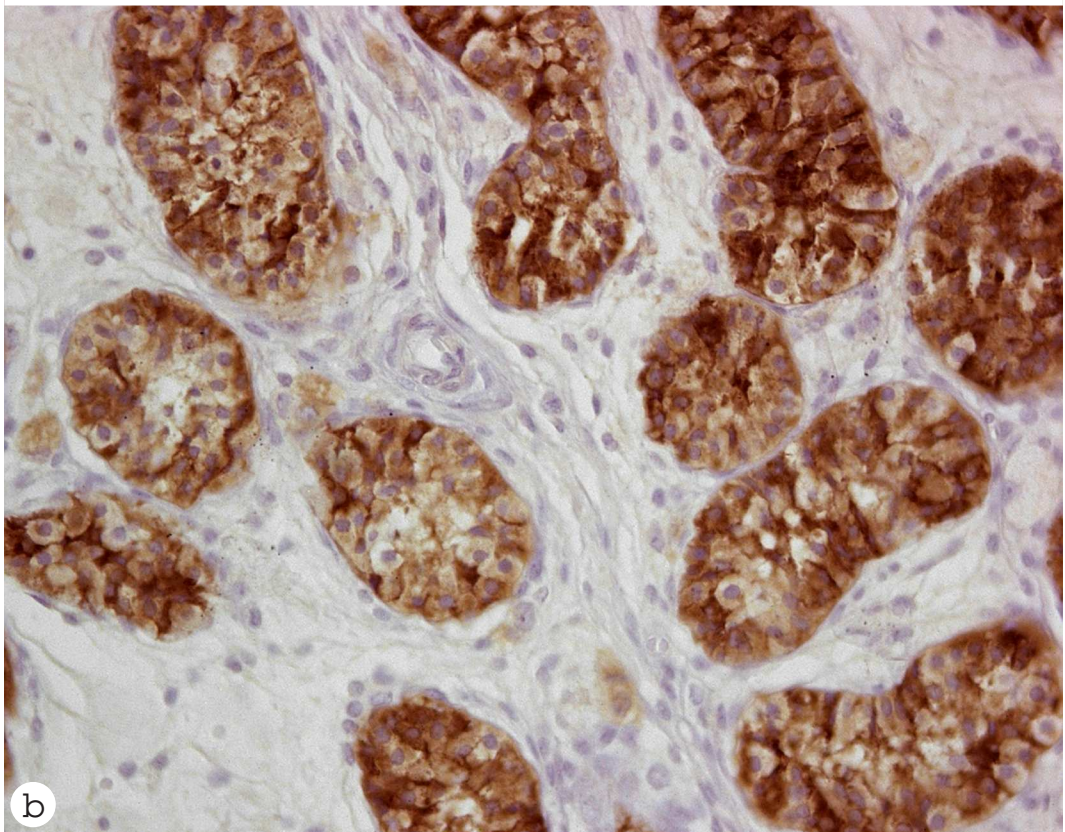
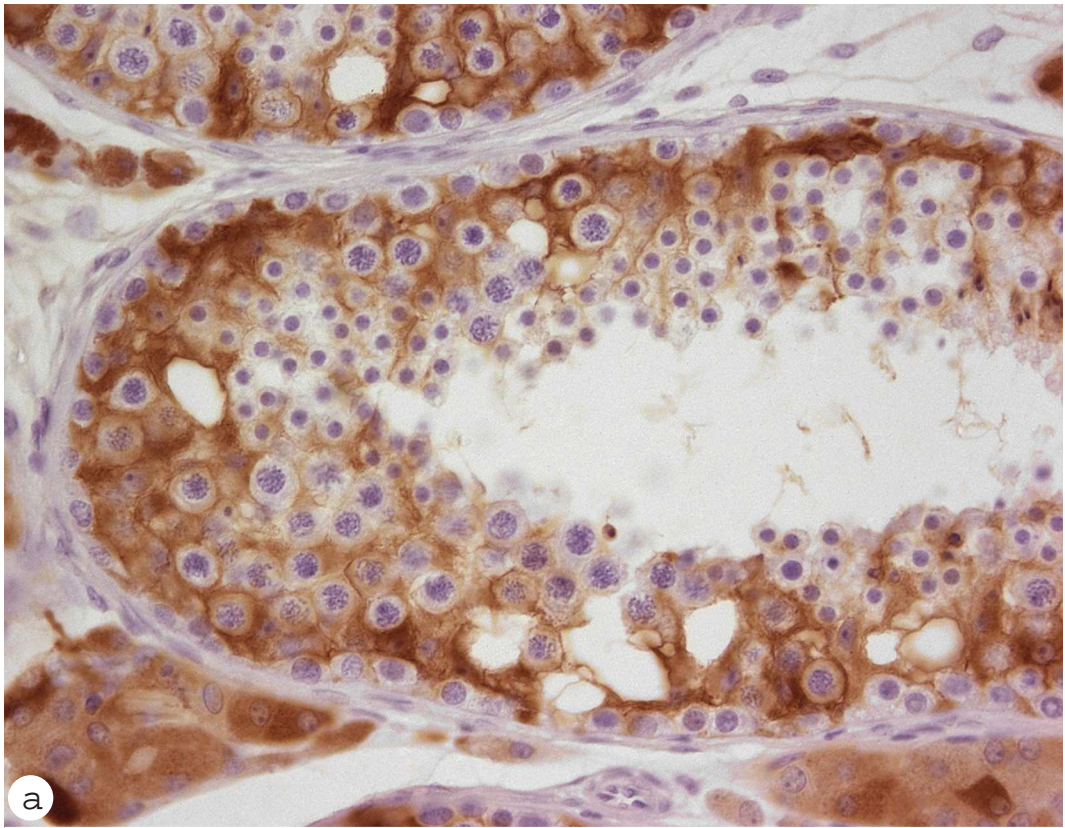
Las secciones se procesaron con el método de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (Complejo SBP), siguiendo el método general inmunohistoquímico, con las modificaciones habituales de nuestro laboratorio,¹⁴²⁻¹⁵⁸ que se especifican a continuación: se realizó la desparafinación completa de las secciones, seguido de la hidratación en alcoholes decrecientes hasta el agua destilada. A continuación se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena de los tejidos mediante peróxido de hidrógeno al 3% a temperatura ambiente durante diez minutos. Los cortes se lavaron en buffer fosfato (PBS) a temperatura ambiente, pH 7,4, durante 5 minutos. Se procedió al desenmascaramiento del epitopo mediante tratamiento por calor; para ello, las preparaciones se introdujeron en buffer citrato a pH 7,6 y se realizó el tratamiento con microondas en dos pases de 2,5 minutos, procurando que las preparaciones no lleguen a hervir, y enfriando las mismas entre cada uno de los pases. Posteriormente, las preparaciones se dejaron reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó un lavado rápido, dos minutos, en H₂O destilada para retirar el sobrenadante de buffer citrato. Lavamos las preparaciones en dos pases de 5 minutos en buffer PBS, pH 7,4. Seguidamente realizamos el bloqueo de las inmunoglobulinas inespecíficas de los tejidos con suero bovino normal durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo el sobrenadante del suero bovino, sin lavar nunca entre este paso y el siguiente. A continuación añadimos el anticuerpo primario anti-Inhibina B (Dako) y anti-RA (Dako); cada uno de ellos a la dilución de 1:500, en una solución de PBS+ BSA al 1%. El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Las secciones se lavaron en tres pases de PBS, de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente. Se añadió a

las secciones el complejo biotinilado anti-ratón, con una dilución 1:200, durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las preparaciones en tres pases de PBS, durante 5 minutos cada pase y a temperatura ambiente. Se incubaron las preparaciones en el complejo Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) (Zymet, San Francisco, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Realizamos tres lavados en PBS durante 5 minutos. La inmunorreacción se reveló con diaminobencidina (Sigma, St. Louis, USA) (30 mg de diaminobencidina en 10 ml de buffer tris-HCl, a pH 7.4 y con H₂O₂ al 0.015 %). El tiempo de revelado con diaminobencidina es de 3 minutos. A continuación, se hizo una tinción nuclear con hematoxilina de Harris. Las preparaciones se lavaron con abundante agua destilada, se deshidrataron en etanol, en concentraciones crecientes, y se montaron en la resina sintética DePex.

Fig. 2. Variación de la expresión inmunohistoquímica de Inhibina B en tubos seminíferos normales y patológicos

a) Sección de tubos seminíferos obtenidos durante la autopsia de un hombre adulto joven normal. Se observa conservación de espermatogénesis completa en la mayor parte de la superficie tubular y un pequeño foco de atrofia epitelial. La expresión de inhibina B es homogénea, aunque muestra un refuerzo de inmunotinción a nivel de las uniones Sertoli-Sertoli. El citoplasma de las células de Leydig muestra expresión de inhibina B.

b) Pieza de orquiectomía correspondiente a un testículo criptorquídico de un paciente postpuberal. Tubos seminíferos atróficos constituidos exclusivamente por un patrón de solo Sertoli con células disgenéticas. Destaca el amplio espectro de intensidad de inmunomarcaje con el anticuerpo anti-inhibina B.



Métodos Morfométricos

Valoración Microdensitométrica de la Expresión de Inhibina B y del Receptor de Andrógenos

Se ha realizado un estudio prospectivo de la cuantificación microdensitométrica de la intensidad de expresión de Inhibina B y del Receptor de Andrógenos (RA), en relación con los diferentes estadios madurativos de los tubos seminíferos normales; así mismo, se ha cuantificado también la Inhibina B y el RA en diferentes patrones de lesiones tubulares de frecuente observación en los testículos de pacientes ancianos. Por último, la expresión de Inhibina B y el RA se cuantificaron microdensitométricamente en diferentes patrones tubulares de distintas lesiones de testículos criptorquídicos.

Para el estudio microdensitométrico, se ha seleccionado una preparación histológica representativa de cada caso, en la que se comprobó una correcta realización del método inmunohistoquímico para la detección de Inhibina B y de RA.

Se han fotografiado entre 25 y 50 campos representativos de las diferentes lesiones encontradas, y procurando que la elección de estas lesiones fuera al azar en cada caso. Las imágenes histológicas fueron capturadas con el objetivo de 40X de un microscopio Leica, asociado a una cámara digital Leica CD200. En cada uno de estos campos se han tomado mediciones mediante el analizador de imágenes Leica con el programa informático Leica DC-Viewer. Para ello, se tomaron las medidas microdensitométricas de alrededor de 20 puntos en cada área del citoplasma de las células de Sertoli inmunoteñido con anti-Inhibina B, y se calculó el valor medio por célula de la intensidad de expresión del RA, esto es, se obtuvo la densidad óptica integrada (DOI) del programa informático Leica Qwin, expresada en unidades arbitrarias, de la expresión del anticuerpo anti-Inhibina B, en relación con las áreas específicas de cada estadio madurativo de la espermatogénesis, o de cada lesión específica del epitelio seminífero. Con respecto al RA, la valoración microdensitométrica se realizó de modo similar, determinado la DOI de la expresión de anti-RA en 20 mediciones por cada núcleo de las células de Sertoli adyacentes a cada lesión específica del epitelio seminífero. Se ha usado un Microdensitómetro estático Leica que está conectado a una cámara digital Leica en color, de alta precisión, y un analizador de imágenes digitalizadas, con un programa informático específico de Leica para las cuantificaciones densitométricas.

De cada determinación microdensitométrica en cada medida nuclear de la expresión de Inhibina B, se obtuvieron tres registros (canales) de color RGB (rojo, verde y azul); a cada uno de estos canales RGB, el sistema informático le aplicó una escala numérica de 0 a 255, de modo que la mayor intensidad de color de cada canal estaría en el número arbitrario 0 y la mínima intensidad de color para cada registro estaría en 255. Dado que la escala numérica es inversamente proporcional a la intensidad de color, la altura de las barras de los gráficos se han representado con el número inverso de la cifra microdensitométrica; sin embargo en las tablas se conserva la cifra emitida por el programa informático Leica QWin. De cada fotografía, además de las mediciones de la porción basal y adluminal del citoplasma de las células de Sertoli inmunomarcado, se tomaron 100 mediciones del valor “blanco”, esto es, del fondo de la preparación sin tejido; de esto modo esta DOI se consideró como el blanco absoluto microdensitométrico (ausencia de color), y las mediciones celulares se modificaron respecto de este blanco. Con esta modificación se consiguió que en todas las fotomicrografías pudiera compararse entre sí la intensidad de expresión de Inhibina B. Puesto que el revelado de la inmunotinción de SBP se realizó con diaminobenzidina que marca la inmunoexpresión de color marrón, se compararon los valores microdensitométricos en los canales rojo y verde que forman aquel color.

Métodos Estadísticos

Los datos fueron recolectados a través de una ficha diseñada específicamente para la presente investigación. Todos los datos se incluyeron y fueron almacenados previamente en el programa Excel y luego se procesaron y analizaron con el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 11.0 (2001), para Windows.

El análisis descriptivo de los datos se realizó mediante tablas de frecuencias y se representan en gráficos de sectores circulares o de barras.

Las variables cuantitativas se resumieron constatando las medidas de tendencia central y dispersión, calculando el promedio y la desviación estándar (DE) de la media. Para la comparación estadística entre dos promedios de variables continuas se utilizó el test de la t de Student (T- test); de otra parte, para la comparación estadística de más de dos grupos, se aplicó el análisis de la varianza ANOVA. Se consideró como significancia estadística un valor de $p < 0,05$.

El análisis de correlación de Pearson fue utilizado para determinar la relación entre dos variables. Un valor de r mayor o igual a 0,5 fue considerado como estadísticamente significativo.

Técnicas Fotográficas

Las imágenes microscópicas han sido capturadas con una cámara digital Leica DC200, almacenadas en formato TIFF y tratadas con el programa Adobe Photoshop 5.0. La composición de las planchas iconográficas se ha realizado con el programa Quark X Press 4.0.

RESULTADOS

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE INHIBINA B

Los resultados de la presente Tesis, de una parte se centran en la descripción de las peculiaridades de la expresión intracitoplasmática de inhibina B e intranuclear del RA en las células de Sertoli en el testículo humano, y de otra, en la cuantificación microdensitométrica de la intensidad de tinción de ambas moléculas en relación con: 1) los diferentes estadios madurativos del ciclo espermatogénético, 2) las alternaciones de hipoespermatogénesis y atrofia tubular propias de la senectud y, por último, 3) en las diferentes lesiones disgenéticas que frecuentemente se encuentran en los testículos de pacientes con criptorquidia.

En relación con el ciclo espermatogénético humano, los tubos seminíferos con espermatogénesis normal presentan una intensidad de inmunotinción de inhibina B semejante en la mayoría de las células de Sertoli. No obstante, las células de Sertoli adyacentes a las áreas tubulares, en las que existe diferenciación de espermátidas redondas y maduras, presentan menor tinción en las zonas en las que la diferenciación germinal no se ha completado, esto es, las que se diferencian hasta espermátidas elongadas. El inmunomarcaje con inhibina B permite delimitar muy bien el citoplasma apical de las células de Sertoli, y, de otra parte, la expresión de inhibina B es mayor en las áreas del citoplasma de las células de Sertoli que se relacionan con la barrera hematotesticular. En definitiva, se ha encontrado una cierta correlación con el grado de expresión de la inhibina B, sobre todo cuando ya se ha completado la segunda división meiótica (Fig. 3). Algunos tubos seminíferos en varones adultos normales y fértiles pueden mostrar pequeños focos de hipoespermatogénesis y de escasa intensidad, en estos casos pueden aparecer las denominadas vacuolas del epitelio seminífero, las cuales en realidad son espacios vacíos consecuencia de las pequeñas pérdidas de células germinales. Alrededor de estos espacios disminuye el marcaje de inhibina B. En algunos casos, se observa una ausencia de inhibina B en la pared de las vacuolas intraepiteliales; aunque el marcaje en el resto del citoplasma de las células de Sertoli puede ser normal. Sin embargo, en aquellos tubos en los que se observa una completa desorganización del epitelio del tubo seminífero, asociado con descamación de células germinales inmaduras y con múltiple formación de vacuolas, la intensidad de immunoexpresión de inhibina B está significativamente disminuida; por ello, existe todo un

gradiente de inmunotinción de inhibina B, desde áreas con robusto marcaje en el citoplasma de las células de Sertoli hasta áreas que carecen de inmunotinción.

En los pacientes de edad avanzada frecuentemente el parénquima testicular presenta un característico patrón histopatológico de atrofia tubular mixta o en mosaico, constituido por tubos seminíferos con espermatogénesis conservada y una adecuada inmunoexpresión de inhibina B, que alternan con otros tubos seminíferos con marcada atrofia del epitelio germinal, múltiples formaciones vacuolares e importante irregularidad en el inmunomarcaje con inhibina B, expresándose en algunas áreas solo como trazas de inmunotinción. También en los individuos de edad intermedia que presentan ya signos de climaterio masculino y cuyo seminograma puede mostrar alteraciones, es frecuente observar algunos tubos seminíferos con un característico patrón de parada en la maduración a nivel del estrato de espermatogonias basales, una lesión que, de ser muy extensa, cursa con infertilidad. En estas áreas de parada destacan la gran variabilidad de expresión de inhibina B, en relación también con las múltiples formaciones vacuolares del epitelio seminífero. Por último, las áreas de atrofia intensa de las células germinales generalmente muestran la ausencia de inmunotinción de inhibina B. En conclusión, en la senectud, los tubos seminíferos se van atrofiando progresivamente y en las áreas que muestran hipoespermatogénesis intensa, la expresión de inhibina B de las células de Sertoli adyacentes disminuye significativamente (Figs. 3-6).

En los pacientes con criptorquidia, los testículos extirpados después de la pubertad (adolescentes e individuos adultos jóvenes) presentan una conservación del marcaje de inhibina B en aquellos tubos que han experimentado el crecimiento puberal y que incluso tienen diferenciación parcial de células germinales (Fig. 7). Contrariamente, estudiando los mismos casos, en las áreas formadas por lobulillos con tubos inmaduros de aspecto disgenético, sólo se observa inmunomarcaje de inhibina B focalmente disminuido y a veces la tinción es muy tenue (Figs. 8 y 9). En estos casos, las células de Leydig experimentan una muy variable expresión de inhibina B, la cual disminuye muy sensiblemente en los nódulos microadenomatosos de células de Leydig frecuentemente observados en los testículos criptorquídicos postpuberales con fibrosis severa (Fig. 10). Estas importantes alteraciones de la expresión de inhibina B también se evidencian, aunque con valores muy variables, en el testículo criptorquídico infantil (Fig. 11). Como hallazgo morfológico incidental, hemos

identificado una robusta expresión de inhibina B en el epitelio de la *rete testis* del testículo normal y del testículo criptorquídico (Fig. 10).

Aunque el grupo de investigación dirigido por el Prof. Nistal previamente había descrito una correlación de la expresión de RA con el ciclo espermatogénico normal, el presente estudio lo confirma, pero además se evidencia que existe una significativa disminución del RA de las células de Sertoli próximas a las áreas de atrofia testicular, también mucho más frecuentemente observadas en los testículos de paciente ancianos (Fig. 12).

En el testículo criptorquídico, el RA tiene un comportamiento en parte semejante al de la inhibina B. El RA se expresa, aunque con una intensidad notoriamente menor, en los tubos que han experimentado transformación puberal (Figs. 13 y 14), sin embargo, en los tubos infantiles con importantes cambios disgenéticos, solo se muestran trazas de RA en algunos núcleos de células de Sertoli, mientras que la mayoría de estos núcleos de células de Sertoli disgenéticas carecen de inmunomarcaje para el RA (Fig. 14). Estos cambios de la expresión del RA son muy profundos y posiblemente de origen congénito, ya que la disminución o ausencia de tinción para RA ya comienza a observarse en los testículos criptorquídicos extirpados en niños prepuberales (Fig. 15). Por último, al igual que hemos descrito para la inhibina B, pero ahora como hallazgo constante, el RA se expresa en todos los núcleos de las células principales de la vía espermática intra y extratesticular, pero además, en los testículos criptorquídicos este inmunomarcaje se conserva en el epidídimo y la *rete testis* con una gran intensidad que no difiere de la encontrada en la vía espermática del hombre joven normal (Fig. 16). Muchas otras peculiaridades morfológicas de la inmunoexpresión de inhibina B y del RA se especifican pormenorizadamente en las leyendas de las figuras histológicas.

Después de las imágenes histológicas, se incluyen los datos cuantitativos microdensitométricos de la expresión de inhibina B y del RA en relación con el ciclo espermatogénico normal, y con las alteraciones de hipoespermatogénesis y atrofia relacionadas con la senectud. Se cuantifican ambas moléculas en los testículos criptorquídicos, en especial en los tubos disgenéticos, comparándolos con el testículo normal. Por último, se compara la expresión de inhibina B y la del RA en cada uno de los patrones de lesión testicular. La cuantificación de inhibina B se refleja en las Tablas 2-4 y Figs.17-27, y la del RA, en las Tablas 5 y 6 y Figs.28-33. Finalmente, se establece la correlación entre la intensidad del inmunomarcaje de inhibina B y del RA en las Tablas 7 y 8 y Figs.34 y 35.

***Fig. 3. Expresión inmunohistoquímica de Inhibina B
en tubos seminíferos normales, en relación con los diferentes
estadios madurativos de la espermatogénesis***

- a) Tubo seminífero con espermatogénesis normal que presenta una intensidad de inmunotinción de inhibina B semejante en la mayoría de las células de Sertoli, objetivándose en todas ellas un mayor marcaje en las zonas del citoplasma perinuclear que en las expansiones del citoplasma apical.
- b) Sección tubular en la que se observan áreas de diferenciación de espermátidas redondas y maduras (área superior de la imagen), en las que las células de Sertoli adyacentes presentan menor tinción que en las zonas del epitelio seminífero con diferenciación de espermátidas elongadas maduras.
- c) La inmunoexpresión de inhibina B es muy intensa a todo lo largo del tubo seminífero, con excepción del foco de diferenciación de espermátidas redondas.
- d) El inmunomarcaje con inhibina B permite delimitar muy bien el citoplasma apical de las células de Sertoli que rodea a células germinales en diferentes estadios madurativos de la espermatogénesis.
- e) Se observan pequeñas variaciones de la alta intensidad de tinción de inhibina B a todo lo largo del tubo seminífero. Destaca la intensa señal inmunohistoquímica de inhibina B en las células de Leydig peritubulares, lo que contrasta con la ausencia de inmunoexpresión de este epitope en las células mioideas peritubulares y en la propia pared tubular.
- f) Acúmulo de espermatoцитos de primer orden que protruyen en la luz tubular. Entre estas células no se evidencia marcaje de inhibina B, debido a una ausencia o mínima cantidad de citoplasma de las células de Sertoli. Adyacentemente, las áreas tubulares con espermatogénesis completa sí exhiben evidente marcaje de inhibina B.

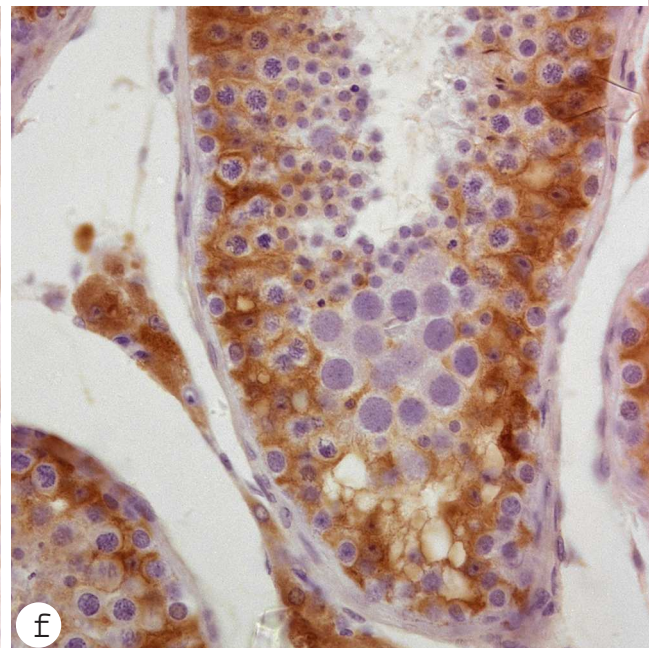
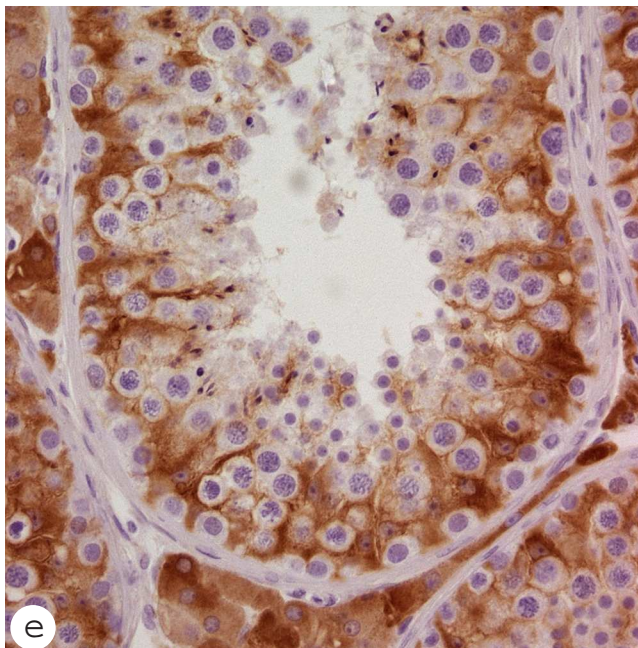
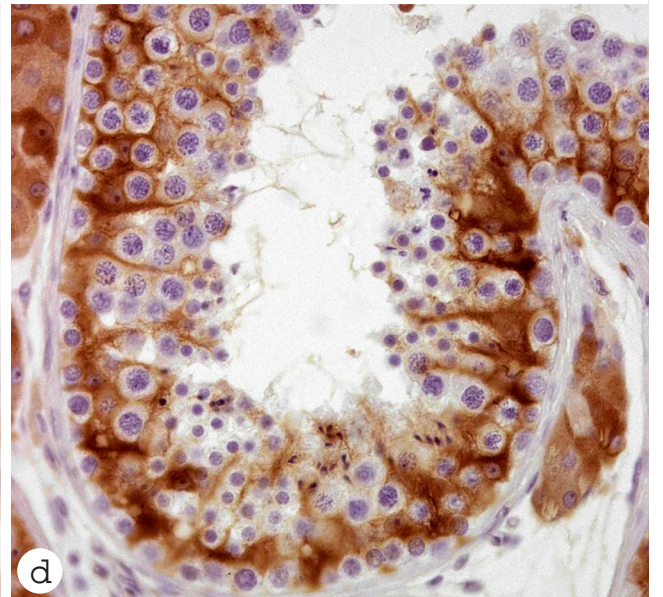
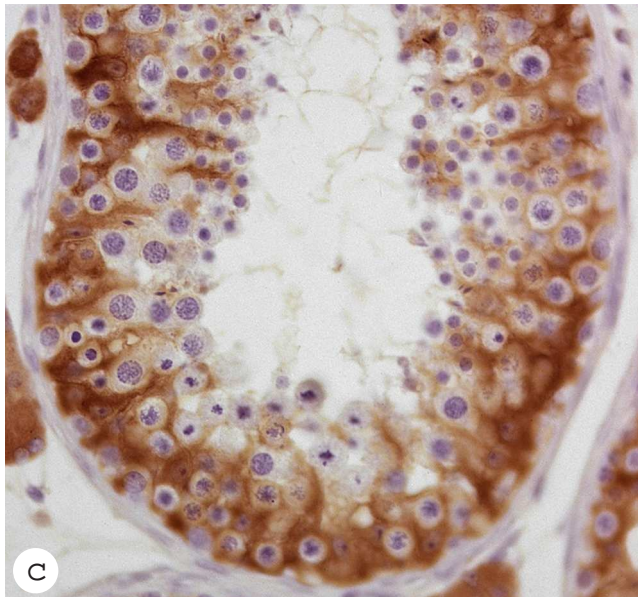
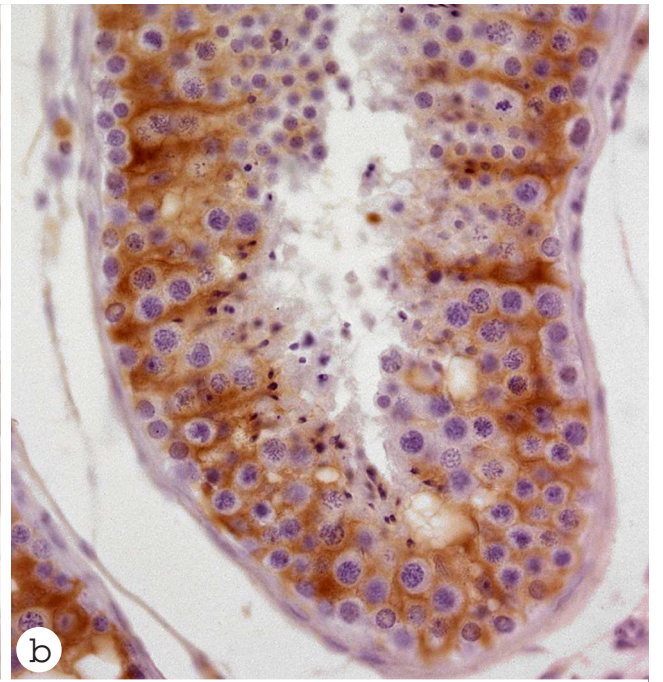
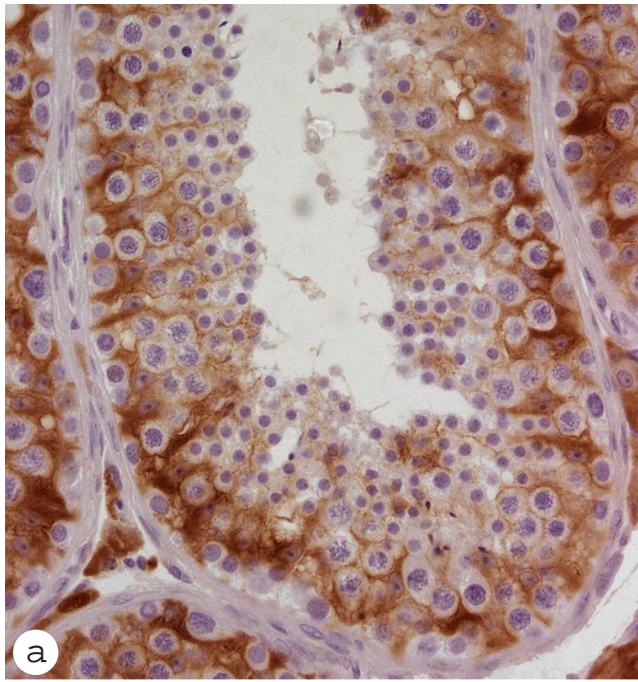


Fig. 4. Alteración de la expresión de inhibina B en relación con las áreas de atrofia focal del epitelio seminífero

- a)** Patrón normal de intensidad de inmunomarcaje de inhibina B en el citoplasma de las células de Sertoli y en el citoplasma de las células de Leydig. Parénquima testicular obtenido en un hombre adulto normal con espermatogénesis conservada.
- b)** Sección transversal de tubo seminífero con hipoespermatogénesis moderada. Nótese la ausencia de inhibina B en la porción superior de la imagen y en las áreas con degeneración vacuolar del epitelio seminífero.
- c)** El tubo seminífero muestra un intenso, aunque variable, inmunomarcaje de inhibina B en el citoplasma de las células de Sertoli, sobre todo en las áreas de su citoplasma que constituyen la barrera hematotesticular. Aquellas áreas de rarefacción de la cohesión de las células germinales y las vacuolas intraepiteliales son rigurosamente inhibina B negativas.
- d)** Múltiples vacuolas intraepiteliales que coalescen entre sí y que carecen de expresión de inhibina B. Las células de Sertoli adyacentes presentan una normal inmunotinción.
- e)** Atrofia multifocal en varios tubos de una biopsia testicular de un hombre adulto que consulta por varicocele y subfertilidad. Destaca la ausencia de inhibina B en la pared de las vacuolas intraepiteliales y un normal marcaje en el resto de las células de Sertoli.
- f)** Tubo seminífero cortado oblicuamente en el que se aprecia mejor un patrón en mosaico del epitelio germinal, caracterizado por áreas con espermatogénesis conservada y normal en el que las células de Sertoli presentan un adecuado, aunque tenue, marcaje de inhibina B correspondiente al estadio madurativo de espermatogonias redondas. Este epitelio normal se continúa con una amplia área de atrofia del epitelio germinal, en el que existen múltiples vacuolas inhibina B negativas rodeadas por células de Sertoli con una mayor intensidad de tinción.

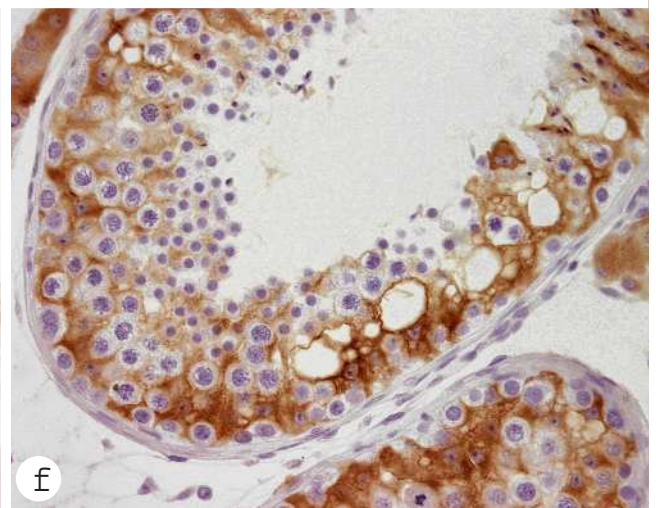
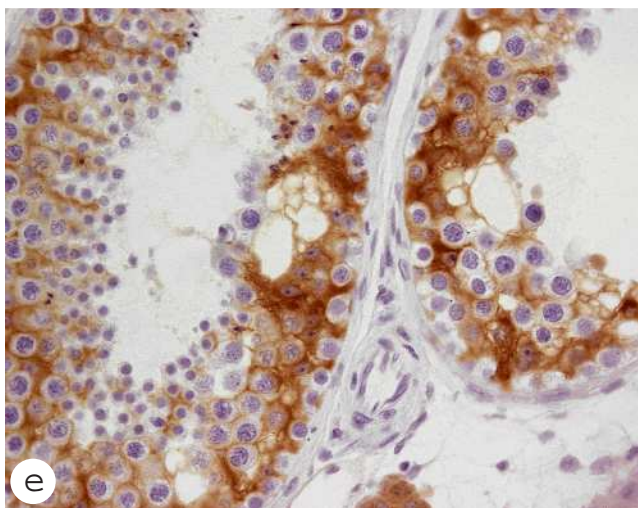
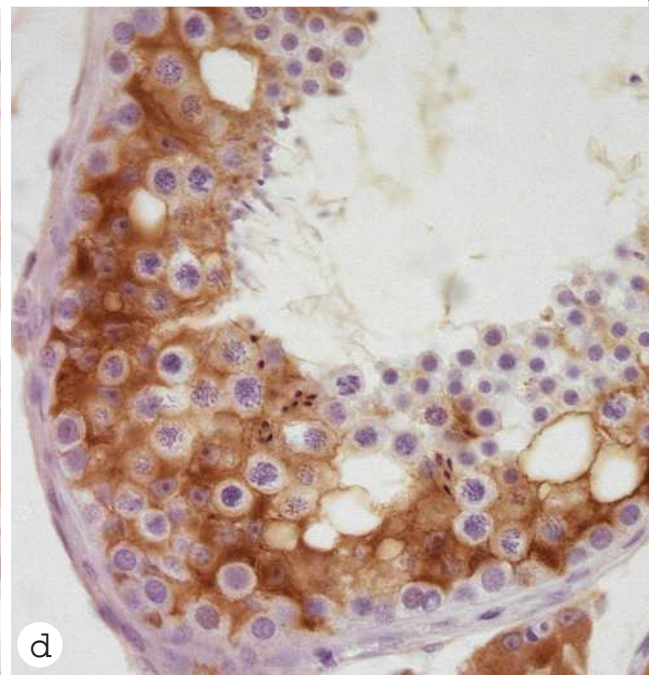
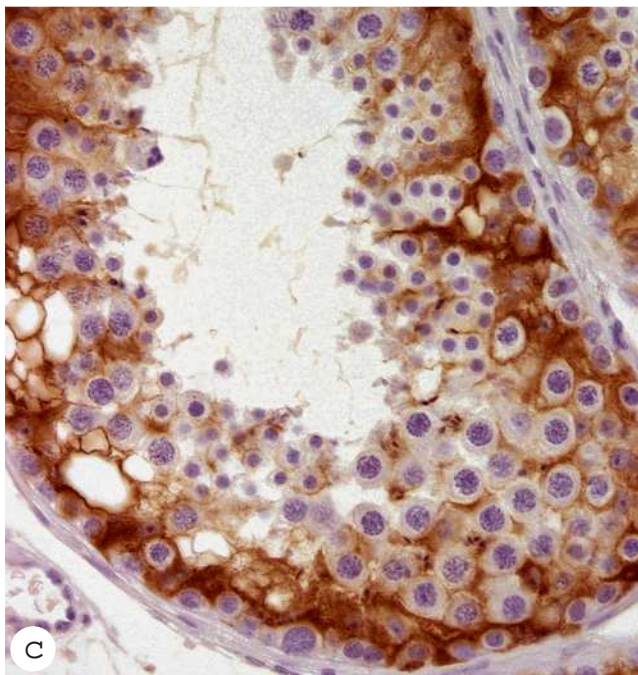
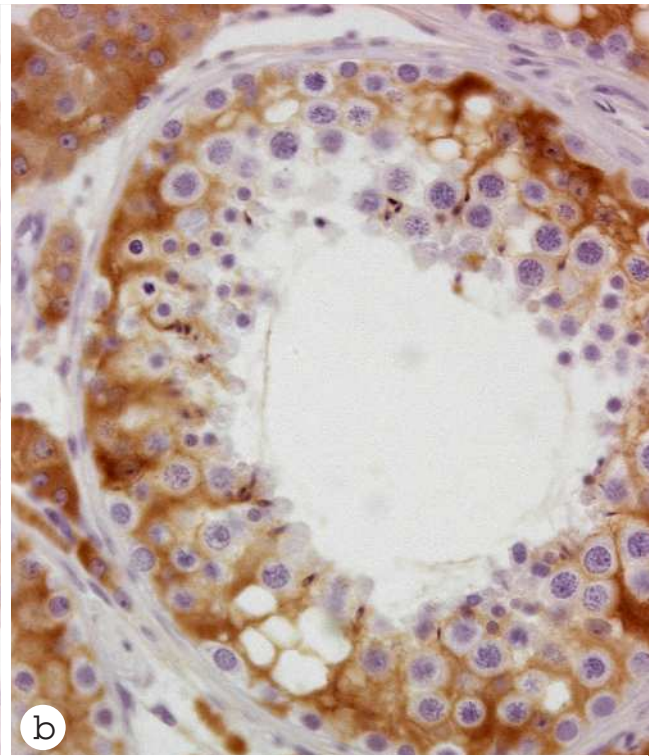
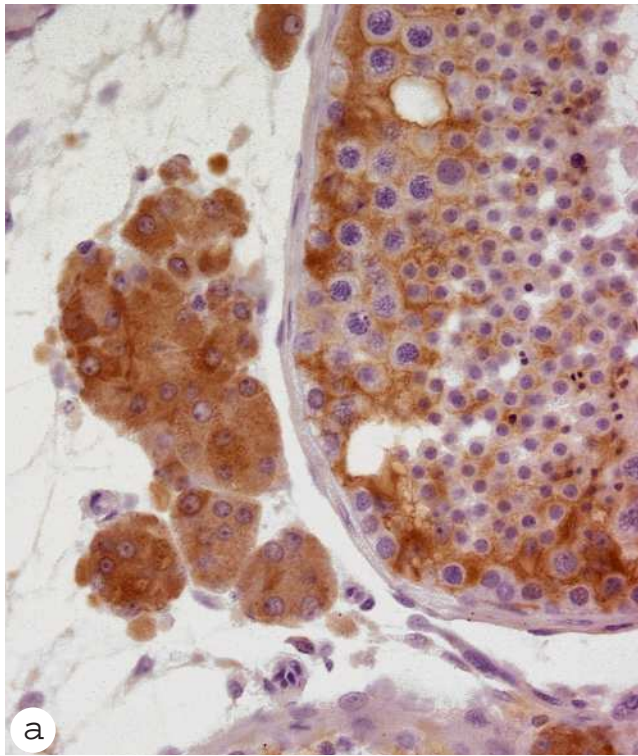


Fig. 5. Cambios del inmunomarcaje de inhibina B en relación con las lesiones progresivas de atrofia del epitelio germinal

- a)** Tubo seminífero con espermatogénesis conservada obtenido en un paciente adulto normal (Grupo Control). Focalmente existen vacuolas intraepiteliales rodeadas por un fino ribete de citoplasma de células de Sertoli con inmunomarcaje de inhibina B.
- b)** Paciente con hipoespermatogénesis moderada y múltiples focos de degeneración tubular del epitelio seminífero. En estas áreas vacuoladas el citoplasma de la célula de Sertoli aparentemente carece de inhibina B.
- c)** Se observa una completa desorganización del epitelio del tubo seminífero asociado con descamación de células germinales inmaduras y con múltiple formación de vacuolas. Destaca una evidente disminución de la intensidad de inmunoexpresión de inhibina B.
- d)** Tubo seminífero cortado longitudinalmente y con intensa dilatación luminal. Nótese la formación de vacuolas intraepiteliales y todo un espectro de inmunotinción de inhibina B, desde áreas con robusto marcaje en el citoplasma de las células de Sertoli hasta áreas que carecen de inmunotinción.
- e)** Sección longitudinal de un tubo seminífero con atrofia intensa del epitelio germinal y evidente irregularidad del inmunomarcaje de inhibina B en el citoplasma de la célula de Sertoli.

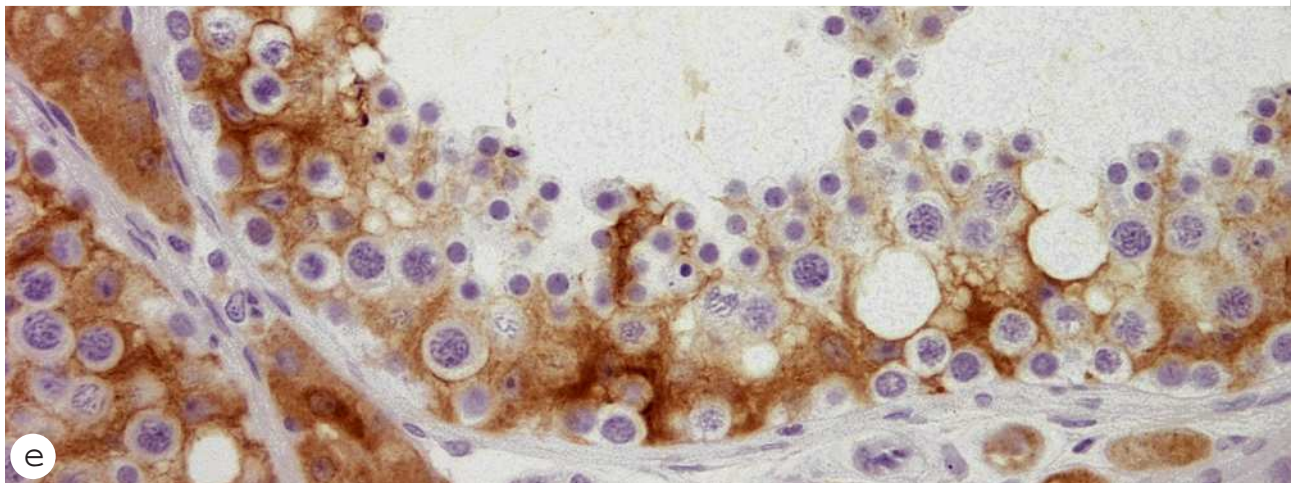
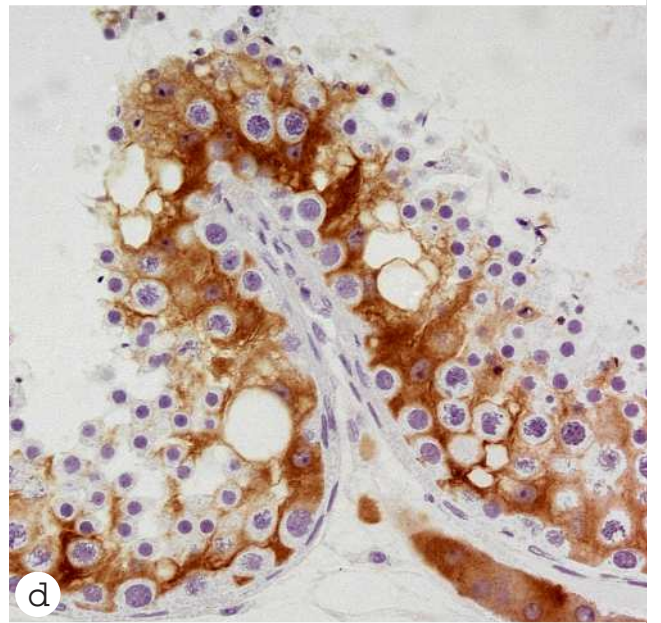
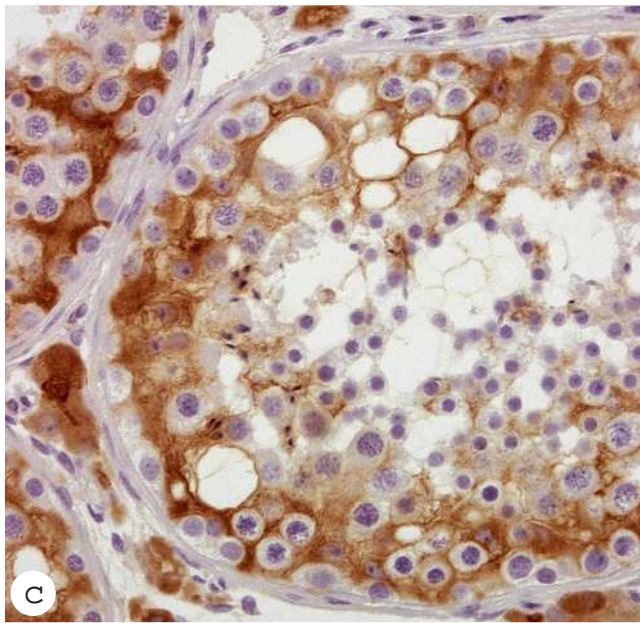
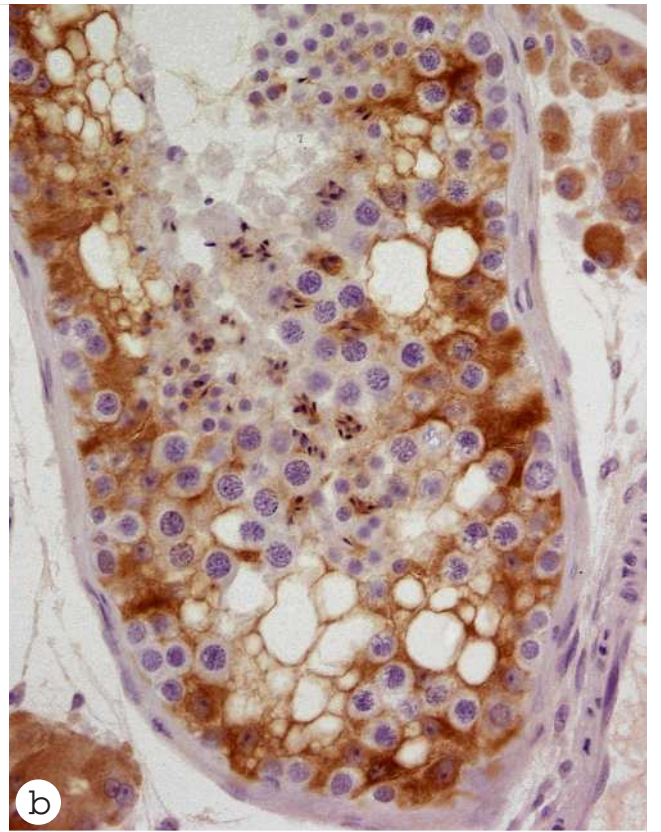
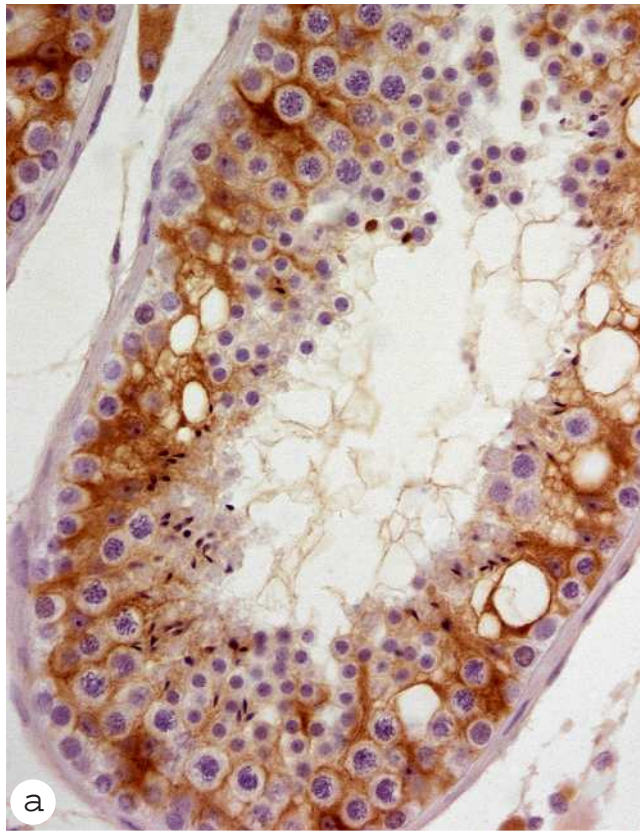


Fig. 6. Alteración de la expresión de inhibina B en relación con atrofia de los tubos seminíferos en la senectud

- a) Parénquima testicular de un paciente de edad avanzada en el que se observa el habitual patrón de atrofia tubular mixta o en mosaico, caracterizado por tubos seminíferos con espermatogénesis conservada y una adecuada inmunoexpresión de inhibina B, con otros tubos seminíferos con marcada atrofia del epitelio germinal, múltiples formaciones vacuolares e importante irregularidad en el inmunomarcaje con inhibina B.
- b) Tubo seminífero atrófico formado por células de Sertoli muy degeneradas que solo muestran vestigios de expresión de inhibina B en las áreas del citoplasma que rodean a las vacuolas intraepiteliales.
- c) Hipoespermatogénesis intensa con un patrón de parada en la maduración a nivel del estrato de espermatogonias basales. Destacan la gran variabilidad de expresión de inhibina B en relación con las múltiples formaciones vacuolares del epitelio seminífero.
- d) Se observa un adecuado inmunomarcaje de inhibina B en el citoplasma de las células de Sertoli en las áreas de hipoespermatogénesis moderada que contrasta bruscamente con la ausencia de inmunotinción en las áreas de atrofia intensa de las células germinales.
- e) Tubo seminífero con atrofia intensa del epitelio germinal y disminución drástica de la inmunoexpresión de inhibina B que queda reducida a una tenue línea de marcate en las áreas de las uniones Sertoli-Sertoli y rodeando a las vacuolas intraepiteliales.

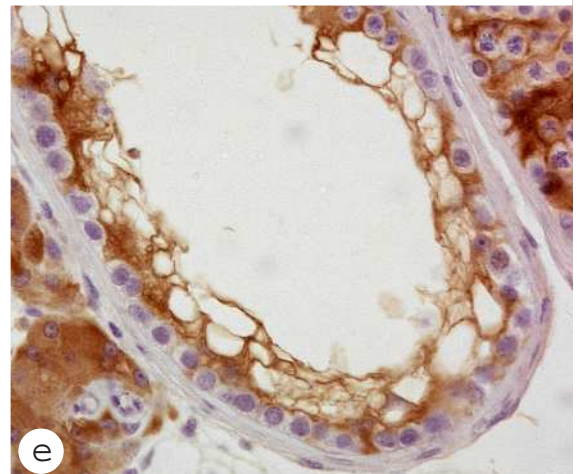
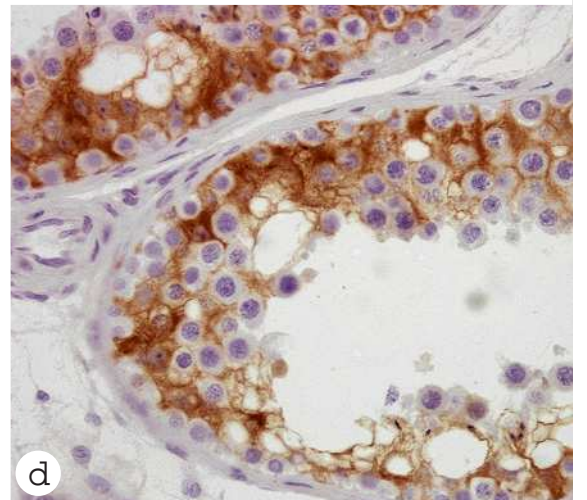
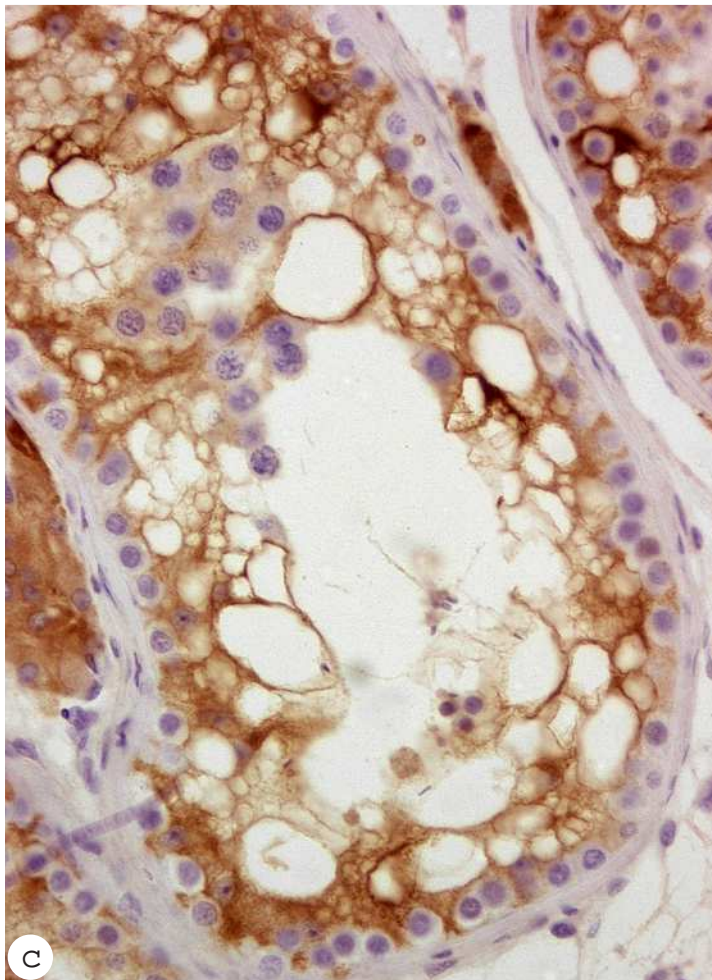
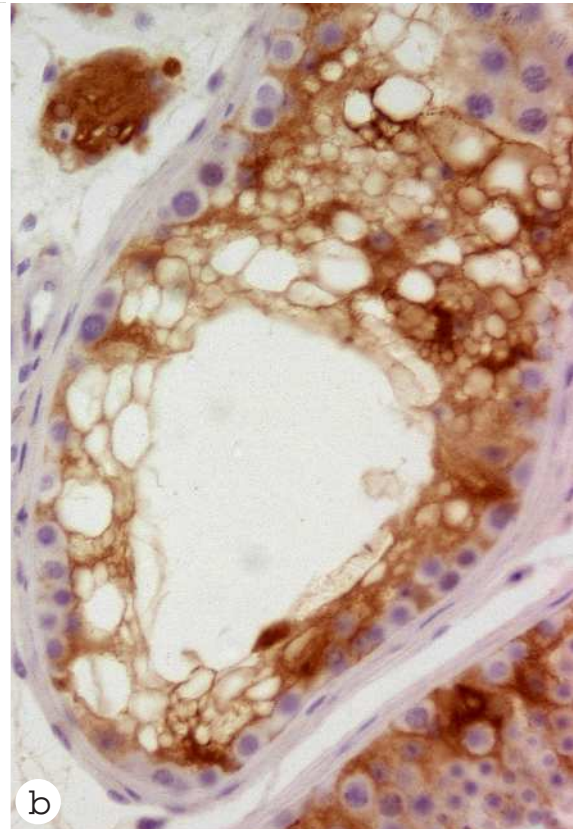
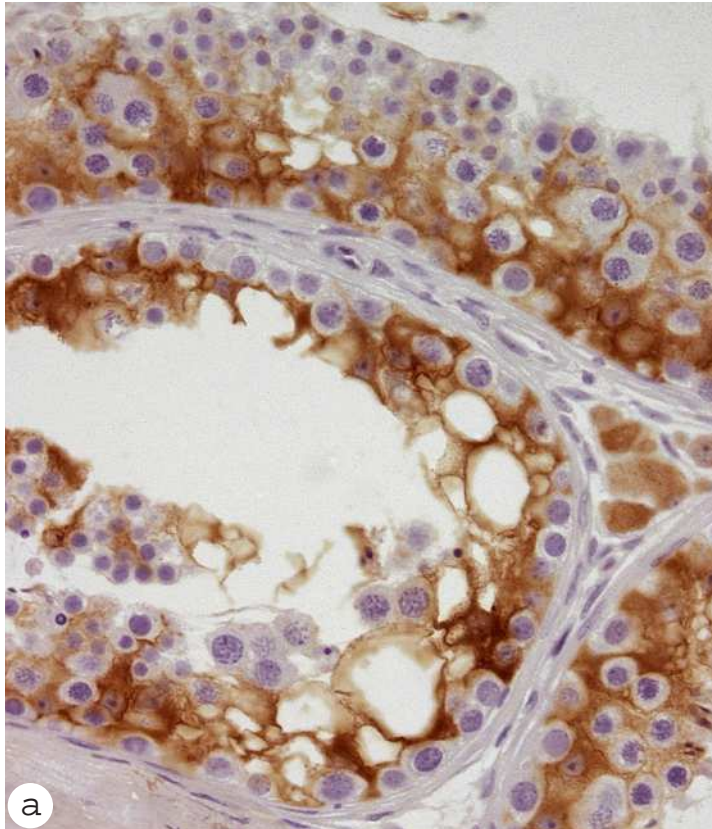


Fig. 7. Expresión de Inhibina B en el testículo criptorquídico postpuberal

- a)** Tubos seminíferos que han experimentado crecimiento puberal aunque muestran marcados signos de atrofia tubular. El intersticio está ampliado y fibrosado, pero las células de Leydig son muy escasas. La valoración inmunohistoquímica de la expresión de la inhibina B demuestra una amplia variabilidad de intensidad de marcaje, con tubos constituidos por un patrón de células de Sertoli disgenéticas con escasa inmunotinción hasta tubos muy inmaduros en los que algunas células de Leydig muestran intensa expresión de inhibina B alrededor del núcleo.
- b)** Tubo seminífero con intensa atrofia del epitelio y dilatación luminal. Las células de Sertoli inmaduras presentan escasa inmunotinción de inhibina B.
- c)** El tubo seminífero central está formado por células de Sertoli disgenéticas que muestran muy escaso marcaje de inhibina B y algunas espermatogonias basales de citoplasma claro que carecen de inmunomarcaje.

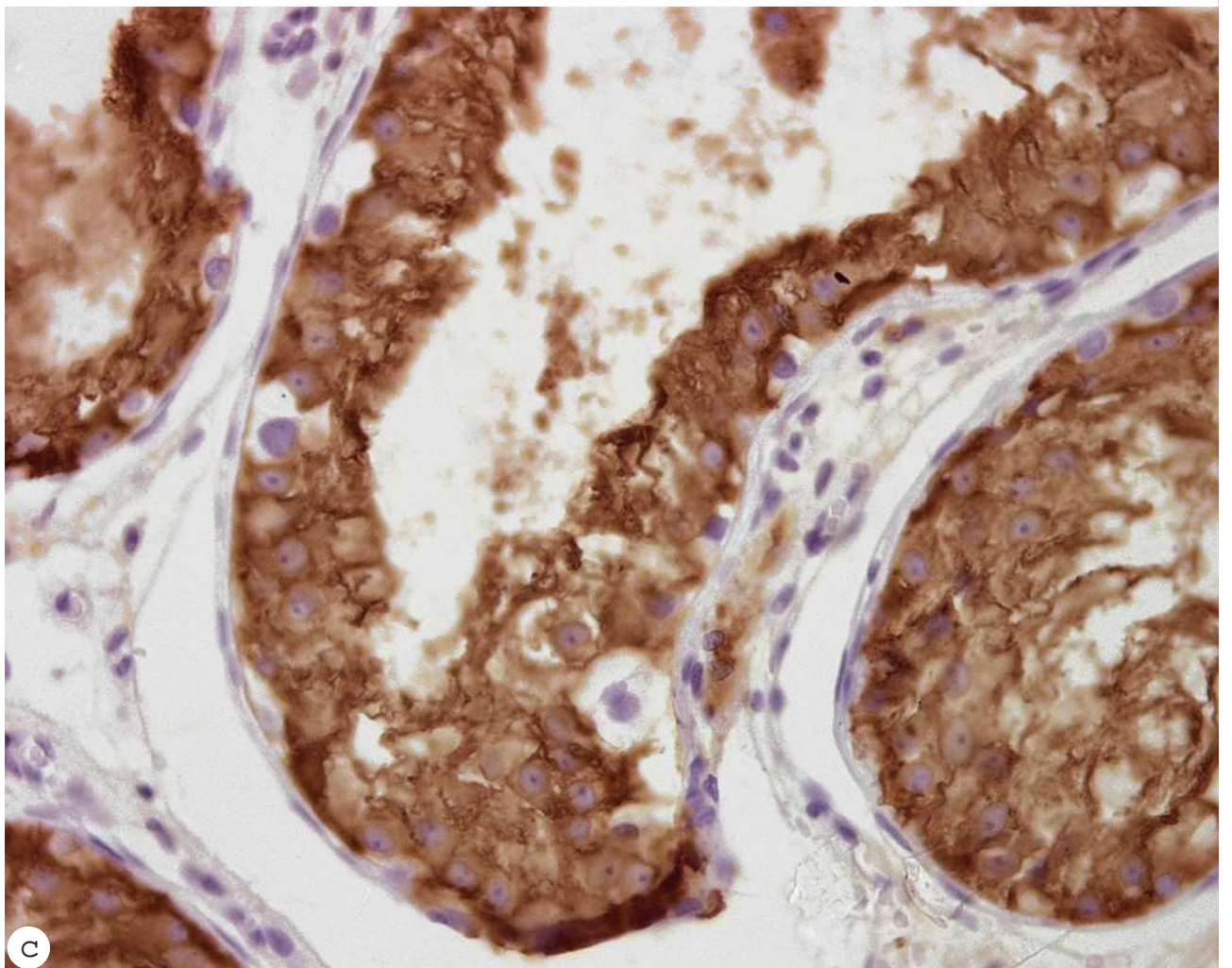
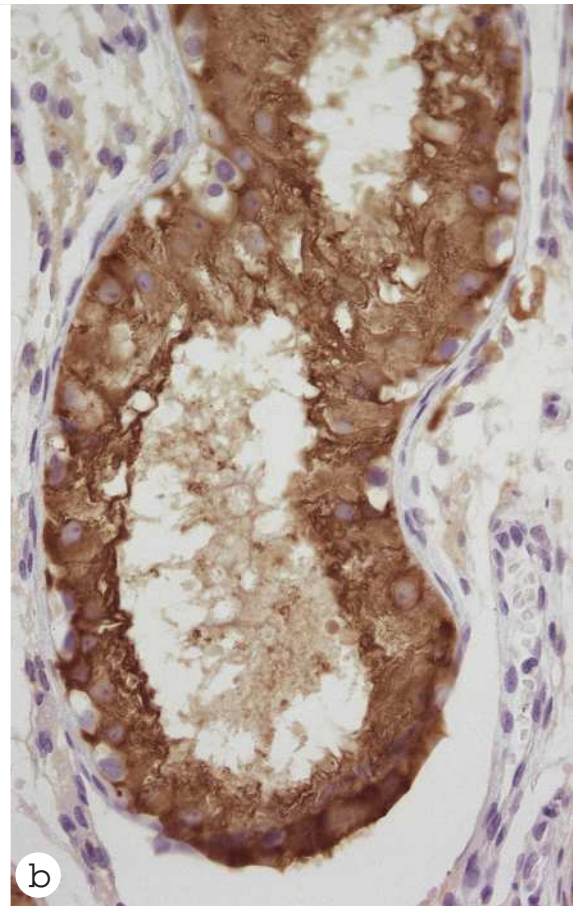
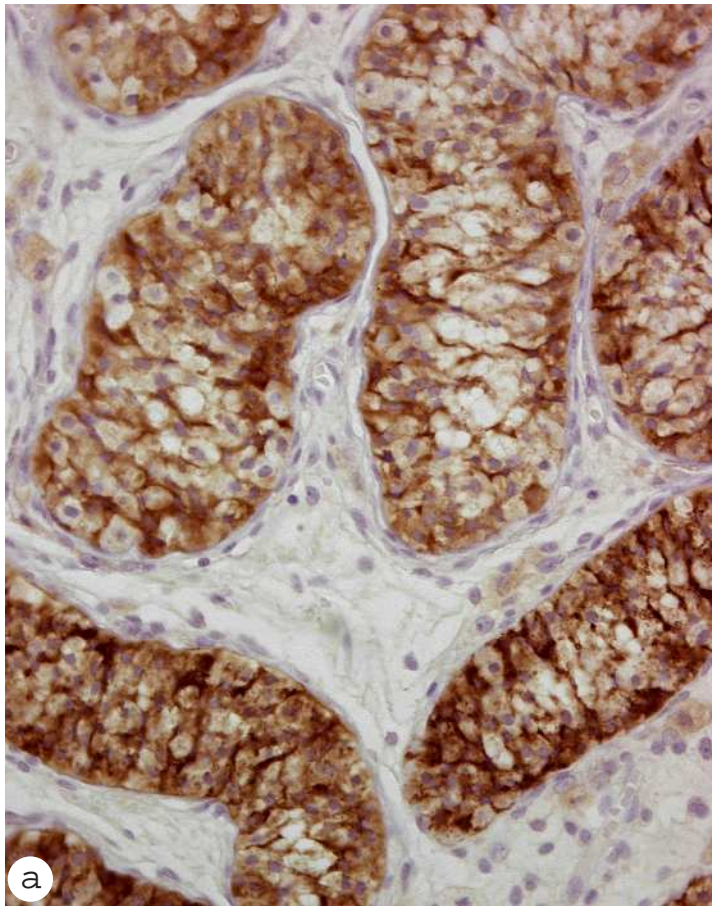


Fig. 8. Expresión de Inhibina B en el testículo criptorquídico postpuberal

- a) Tubo seminífero postpuberal de moderado tamaño pero constituido por un patrón de solo Sertoli. La expresión de inhibina B en las células de Sertoli es muy irregular, siendo ligeramente mayor en las carillas laterales y en el citoplasma perinuclear.
- b) Las células de Sertoli inmaduras sólo muestran vestigios de expresión de inhibina B. El intersticio está fibrosado y las escasas células de Leydig disgenéticas sólo presentan trazas de inmunotinción.
- c) Tubos seminíferos marcadamente atróficos y disgenéticos con evidente disminución de inhibina B en las células de Sertoli. En el intersticio se observan nidos de células de Leydig inmaduras pero que aún contienen una tenue expresión de inhibina B.
- d) La imagen está centrada en un tubo seminífero malformado, de contorno muy irregular constituido por un patrón de solo Sertoli de células disgenéticas. Algunas células de Sertoli presentan una expresión filiforme de inhibina B, pero la mayoría de ellas sólo muestran una fina inmunoexpresión intracitoplásmica de tipo granular. En el intersticio se evidencia una importante linfangiectasia, pero no se observan células de Leydig maduras ni vestigios de expresión de inhibina B en las células intersticiales.

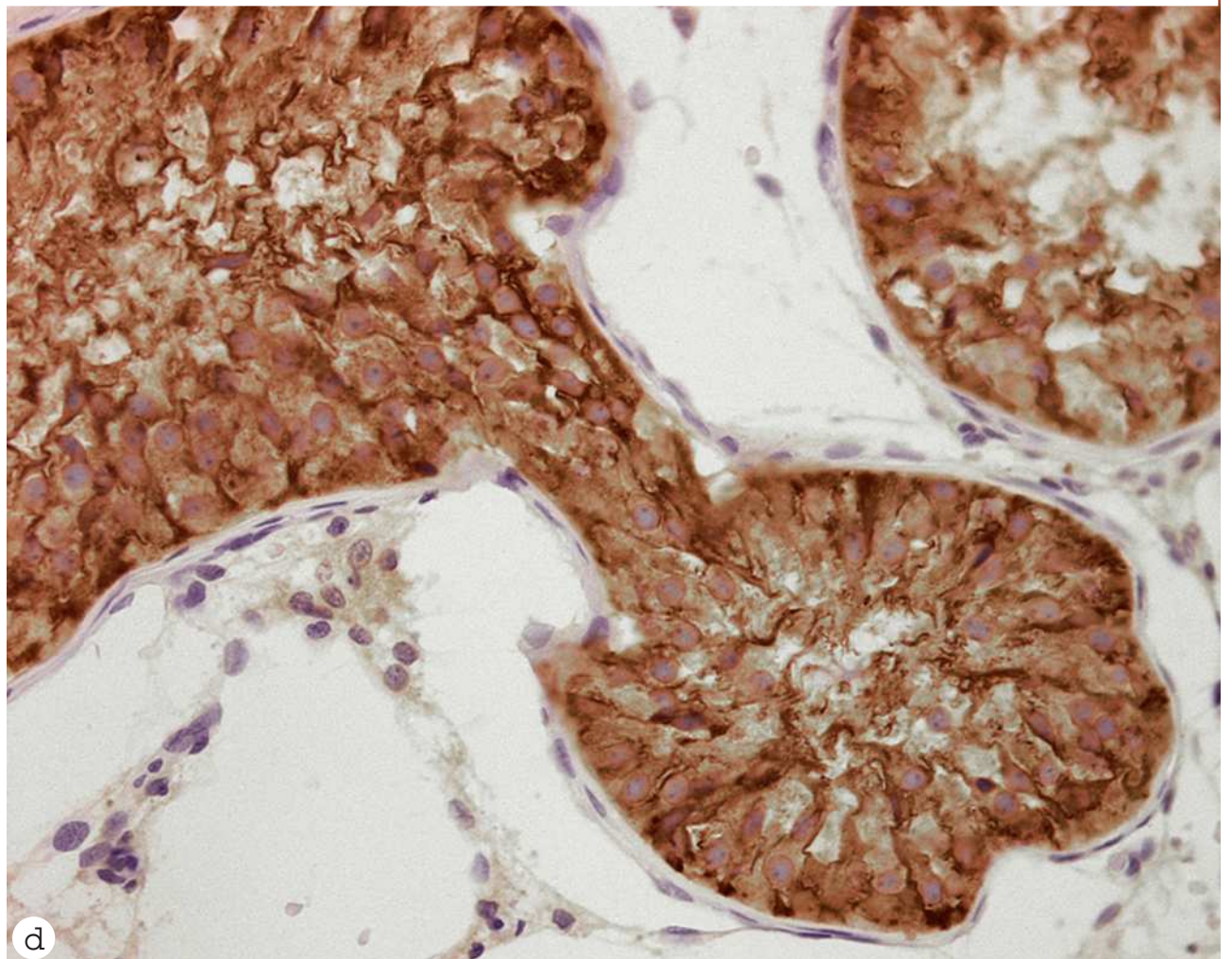
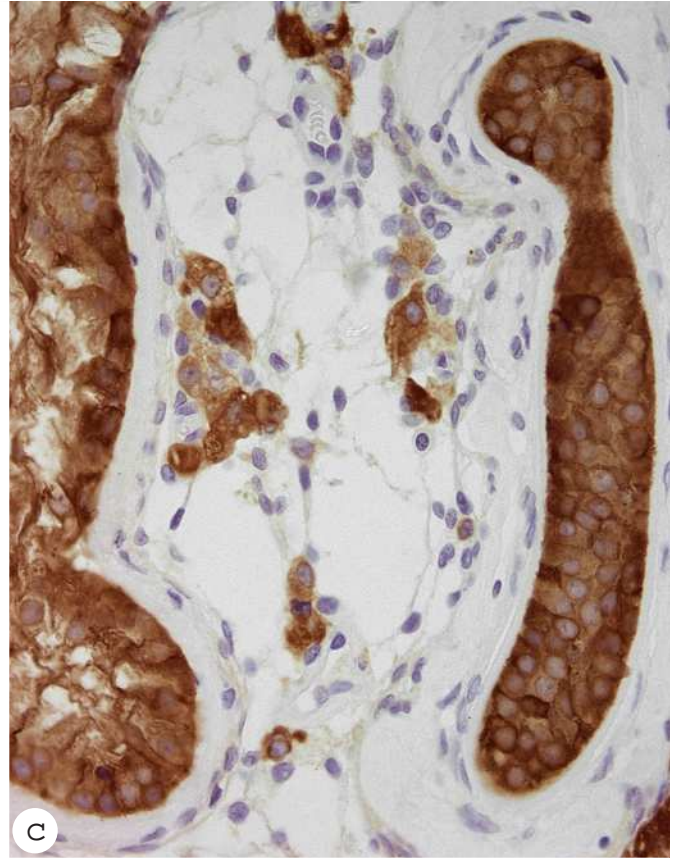
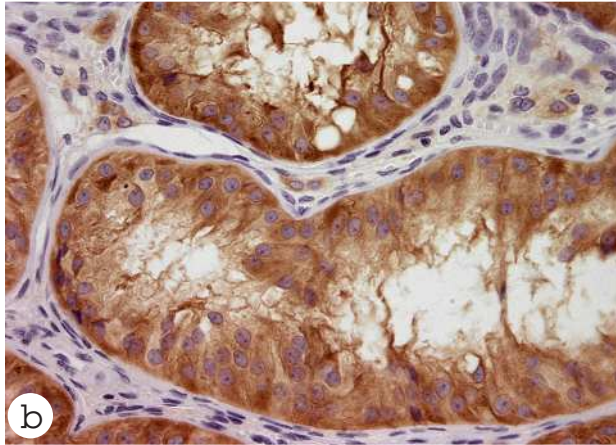
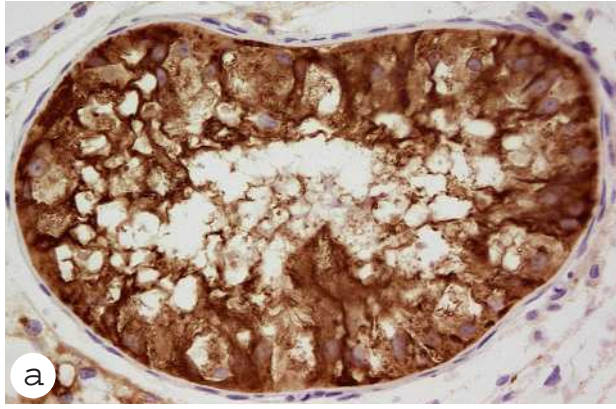


Fig. 9. Expresión de Inhibina B en el testículo criptorquídico postpuberal

- a)** Tubos seminíferos atróficos con células de Sertoli de núcleo redondo y disgenéticas y moderada o mínima expresión de inhibina B.
- b)** Los tubos seminíferos atróficos con células de Sertoli disgenéticas presentan una importante heterogeneidad de inmunotinción: desde tubos con robusta expresión de inhibina B, hasta tubos con células de Sertoli rigurosamente negativas para inhibina B.
- c)** La mayor parte de las células de Sertoli de los tubos seminíferos atróficos carecen de inmunomarcaje de inhibina B, o la expresión de este epítopo es muy escasa, irregular y completamente diferente del amplio inmunomarcaje perinuclear y filiforme característico de las células de Sertoli normales.
- d)** La mayoría de las células de Sertoli disgenéticas sólo muestran trazas de expresión de inhibina B; sin embargo, algunos tubos seminíferos extraordinariamente atróficos aún conservan marcaje de disposición perinuclear con el anticuerpo anti-inhibina B.

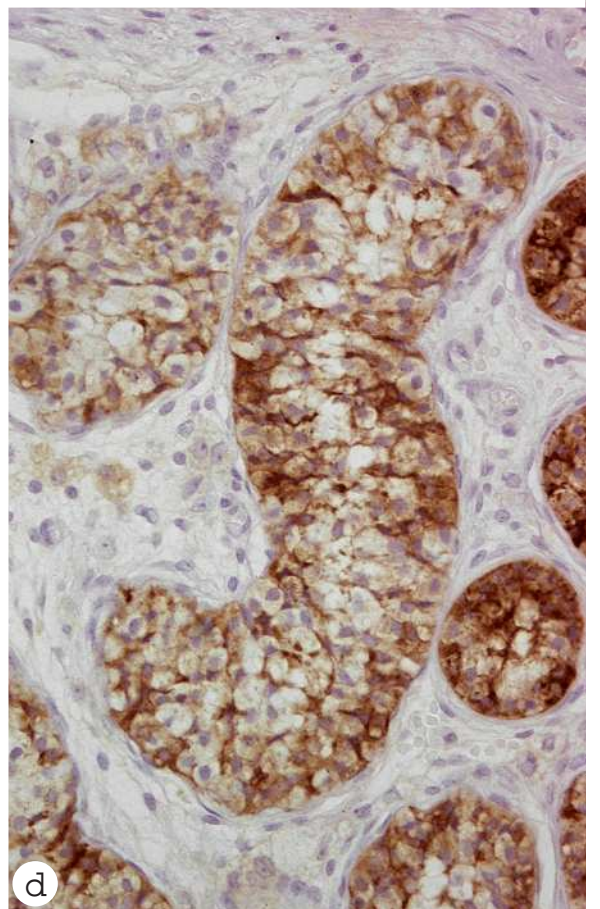
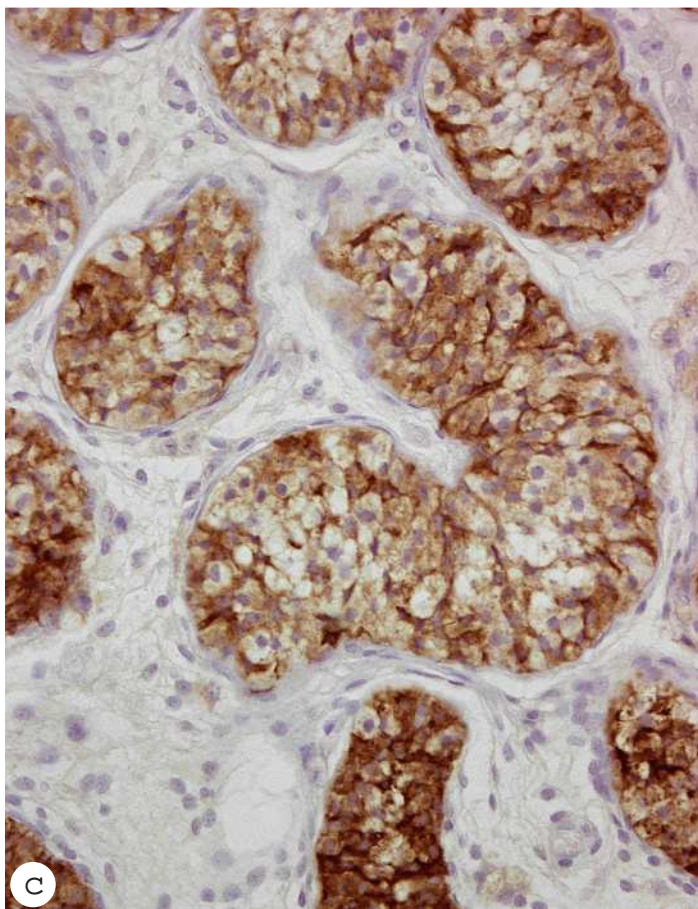
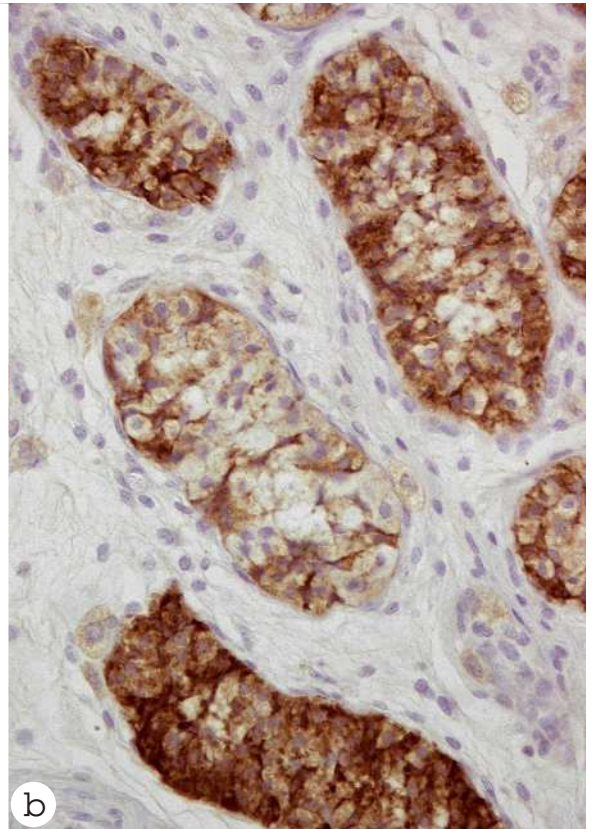
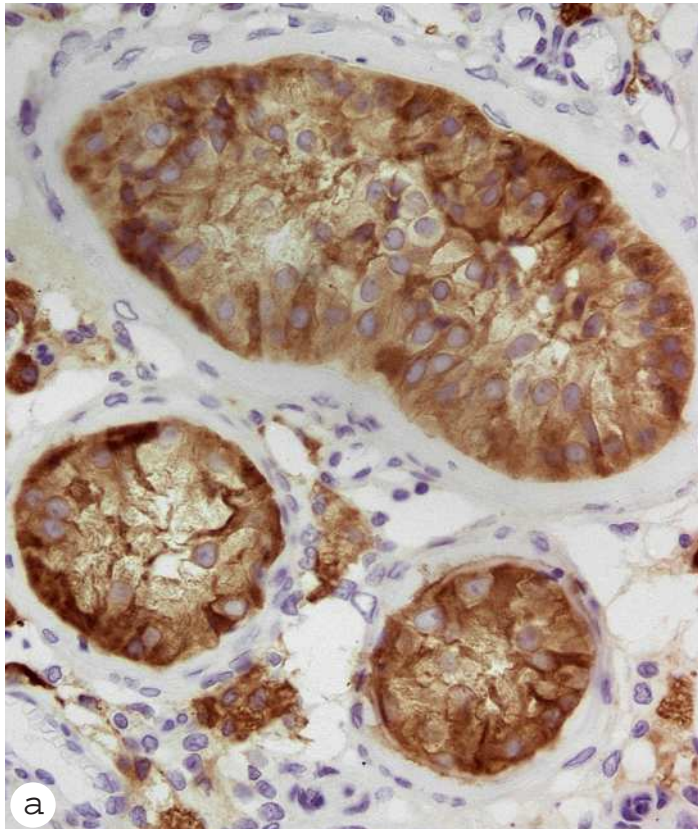


Fig. 10. Expresión de Inhibina B en las células de Leydig y en la vía espermática del testículo criptorquídico postpuberal

- a) Hiperplasia nodular de células de Leydig en un testículo criptorquídico de un hombre adulto. Nótese el amplio espectro de intensidad de inmunoexpresión de inhibina B en el citoplasma de las células de Leydig.
- b) Tubo seminífero parcialmente hialinizado en el seno de un nódulo de células de Leydig con distinta expresión de inhibina. La mayoría de las células de Leydig son disgenéticas y presentan una pobre expresión de inhibina B. En el interior del tubo se observan células inhibina positivas, posiblemente correspondan a células de Leydig atrapadas por la fibrosis tubular.
- c) El nódulo de células de Leydig contiene células muy inmaduras y disgenéticas, con moderada o baja actividad inmunohistoquímica de inhibina B. También se observan células elongadas que carecen de inmunotinción.
- d) En el mismo caso, las células de Leydig hiperplásicas presentan variable expresión de inhibina B.
- e) Tubos seminíferos situados en la vecindad de la *rete testis*. Existe una intensa inmunoexpresión de inhibina B en el citoplasma de las células de Sertoli, de las células de Leydig y de las células principales de la *rete testis*. Las células cilíndricas de la *rete testis* muestran una débil inmunotinción de inhibina B, y algunas carecen de inmunoexpresión.
- f) Células cilíndricas de la *rete testis* que muestran un aspecto pseudoestratificado y una robusta inmunotinción de inhibina B en el citoplasma apical.
- g) Se observa una idéntica expresión de inhibina B en ambos tipos, cúbico y plano, del epitelio de revestimiento de la *rete testis*. Algunas células escamosas tienen mínima expresión de inhibina B.
- h) Brusca transición entre el epitelio cúbico pseudoestratificado y el epitelio plano de la *rete testis*. No existen diferencias de intensidad de inmunomarcaje entre ambos tipos de epitelio.

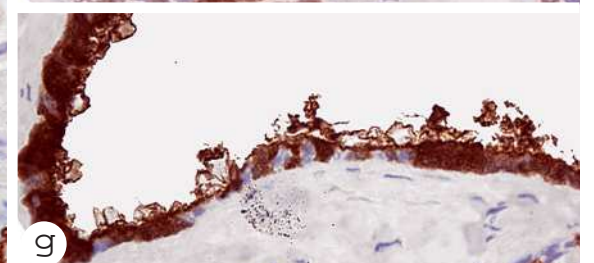
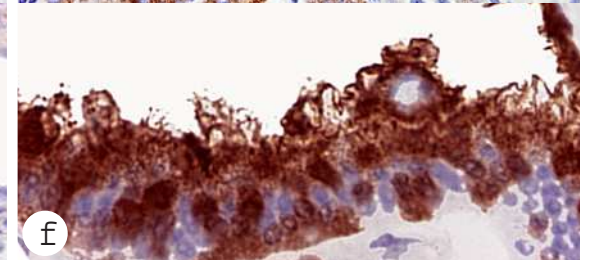
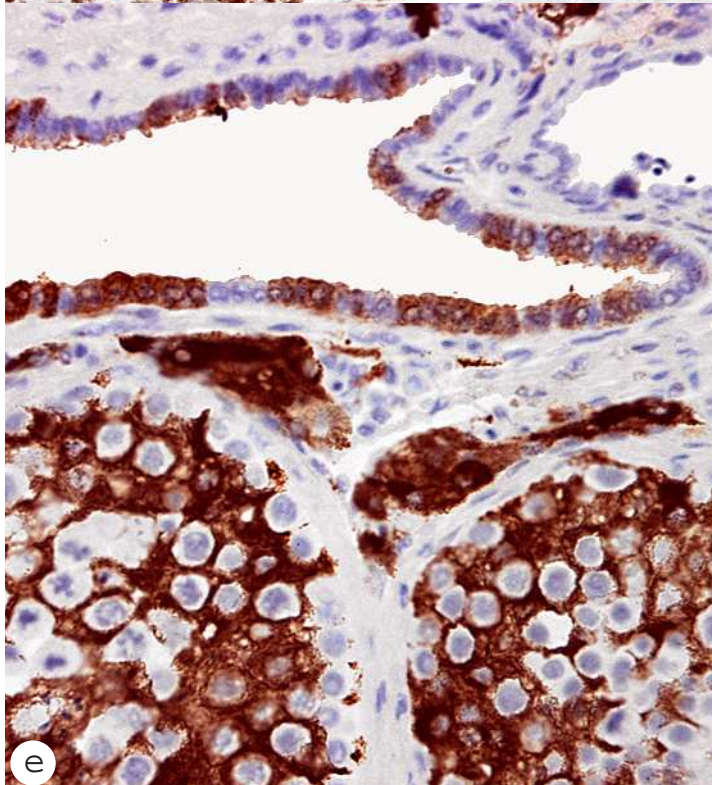
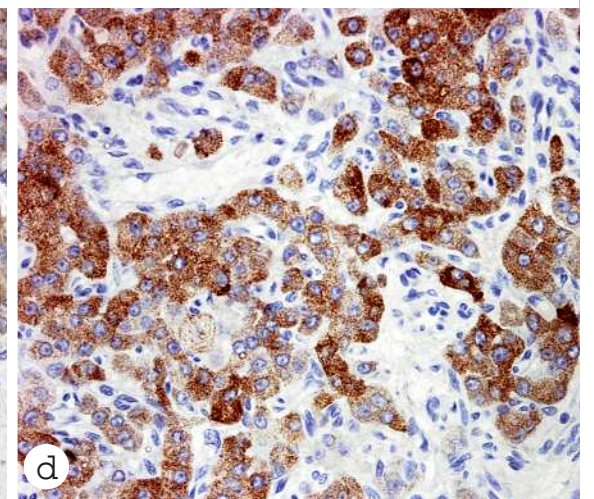
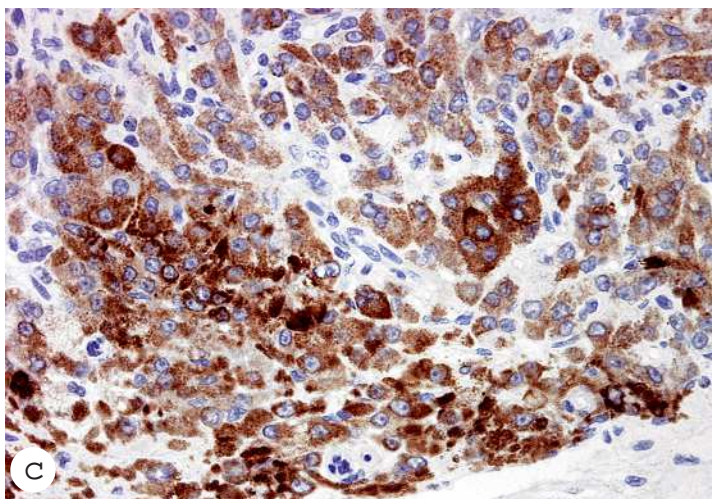
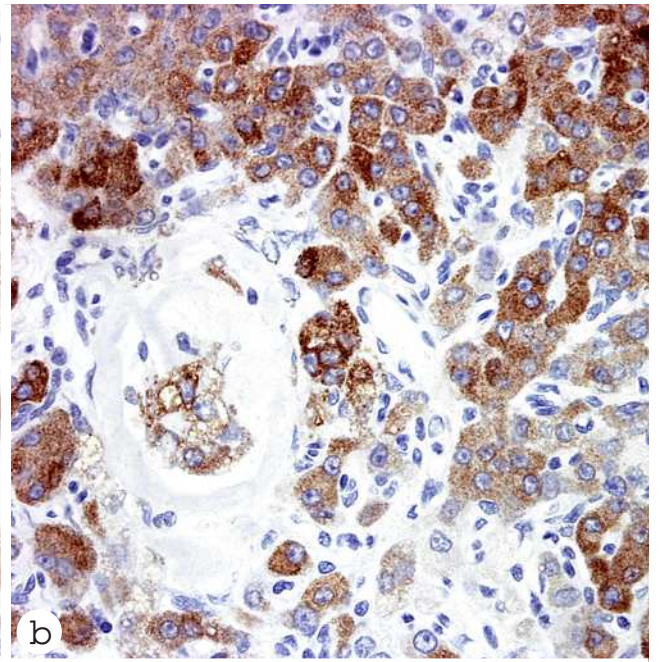
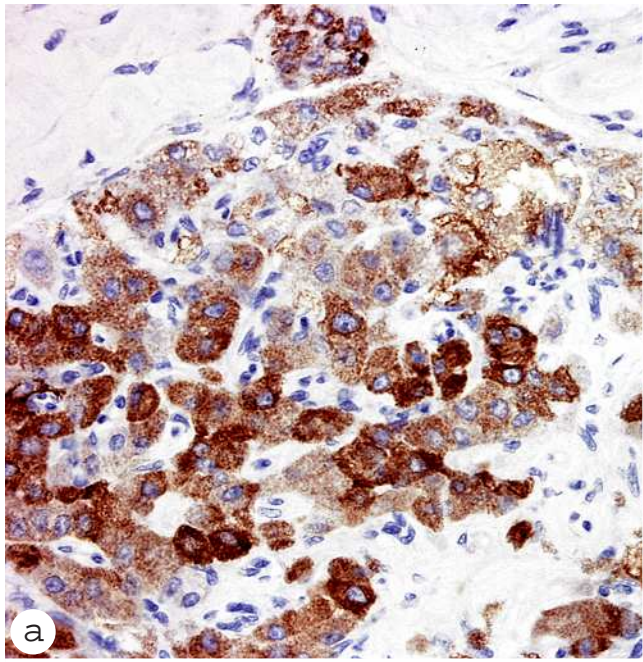


Fig. 11. Expresión de Inhibina B en el testículo criptorquídico infantil

- a)** Parénquima testicular con intersticio ampliado y tubos seminíferos de reducido tamaño desprovistos de células germinales (Criptorquidia tipo III). El inmunomarcaje de inhibina B queda reducido a una tenue tinción granular e irregular.
- b)** Testículo criptorquídico de un niño con lesiones de criptorquidia tipo II. Algunos tubos seminíferos aún conservan células germinales rodeadas por células de Sertoli con una moderada expresión de inhibina B. En la porción superior de la imagen, se observa un tubo seminífero con la característica disposición anular de las células de Sertoli disgenéticas, las cuales sólo presentan vestigios de inmuoexpresión de inhibina B. En el intersticio, se observan algunas células de Leydig inhibina positivas.
- c)** Tubos seminíferos disgenéticos. Son muy escasas las células de Sertoli con intensa expresión de inhibina B. En el intersticio las células mesenquimales carecen de inmunotinción.
- d)** Todos los tubos seminíferos de la imagen presentan escasa tortuosidad con pocas secciones transversales y signos indirectos de disgenesia. La mayoría de las células de Sertoli presentan un tenue inmunomarcaje para inhibina B. Las células del intersticio tienen un aspecto inmaduro y carecen de inhibina B.
- e)** Otro campo microscópico del caso anterior en el que los tubos disgenéticos presentan hiperplasia de células de Sertoli, la mayoría de las cuales carecen de inhibina B o el inmunomarcaje es muy tenue. La mayoría de las células intersticiales son de tipo mesenquimal inmaduro inhibina B negativas. En la parte derecha de la imagen, se observa un cúmulo de células de Leydig disgenéticas con escaso citoplasma y sólo vestigios de secreción de inhibina B.

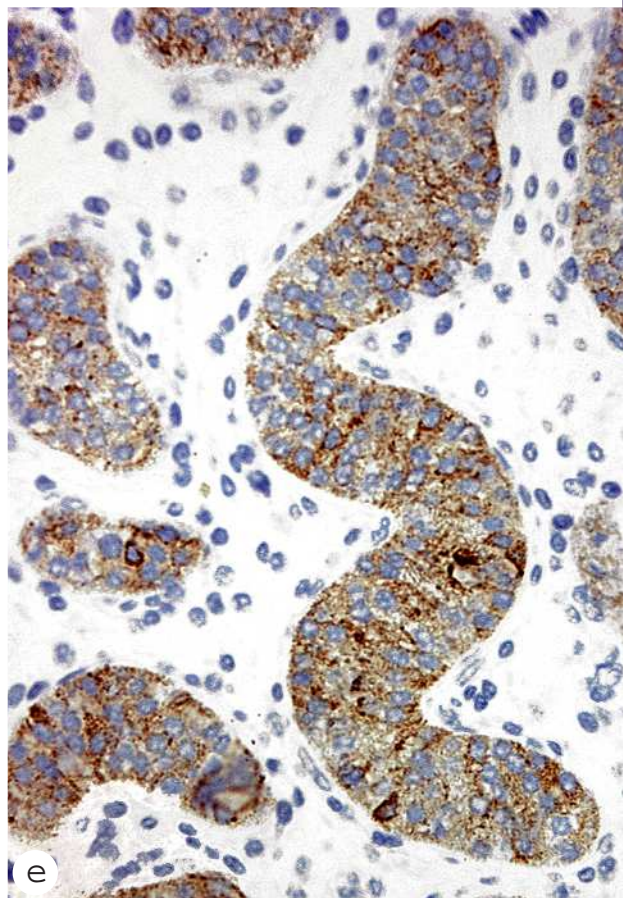
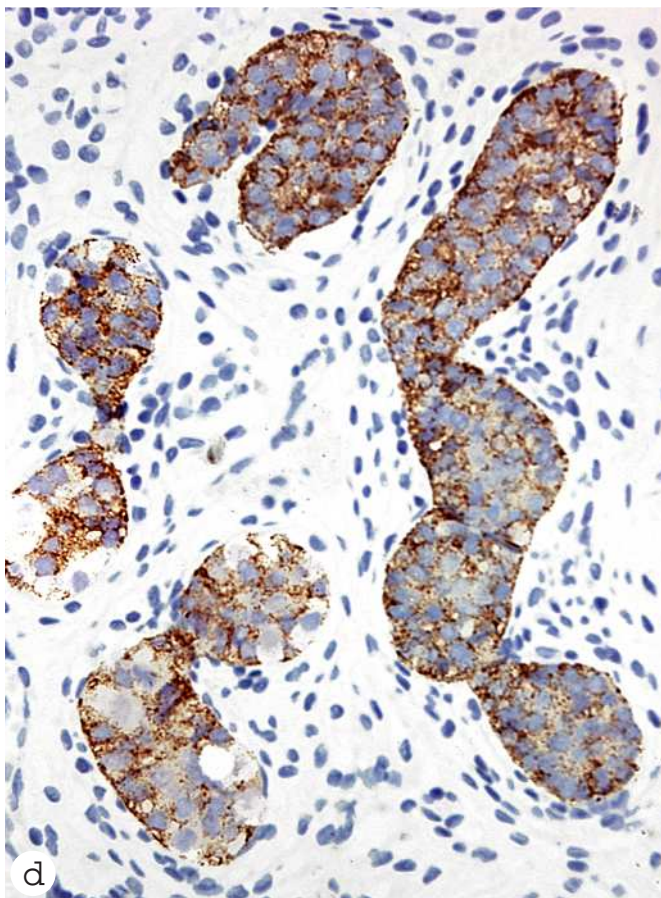
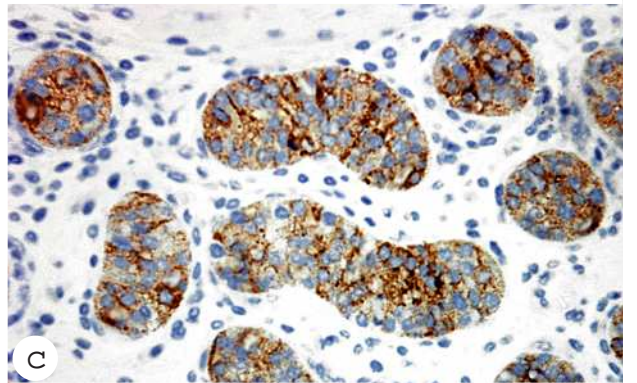
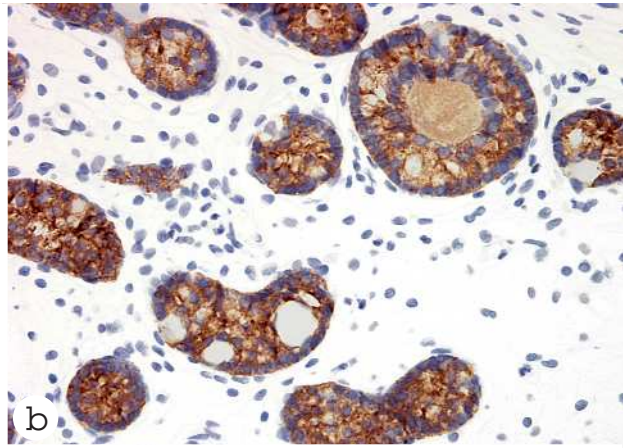
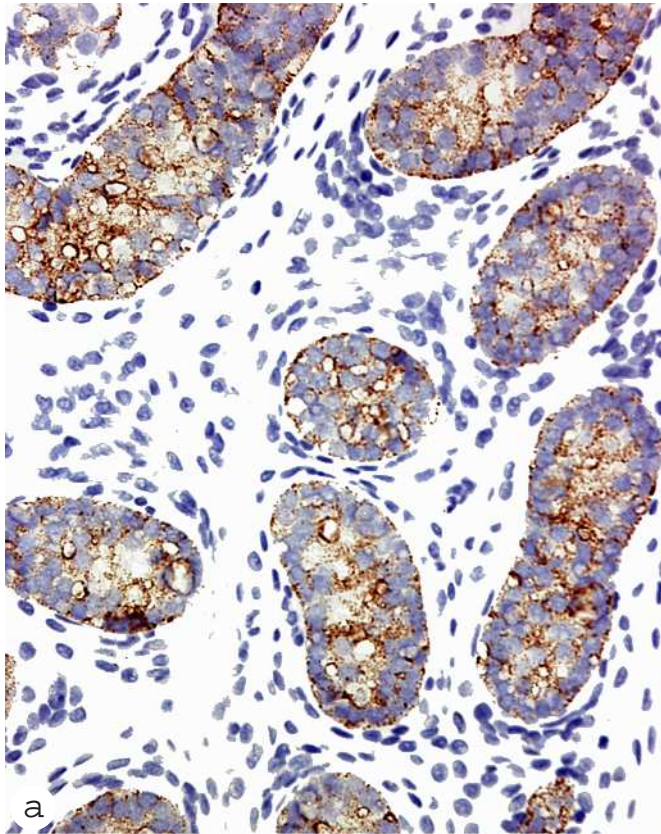


Fig. 12. Expresión del receptor de andrógenos en el testículo postpuberal normal

- a)** Tubo seminífero con espermatogénesis conservada y pequeña dilatación luminal. La mayoría de los núcleos de las células de Sertoli muestran una robusta inmunoexpresión del receptor de andrógenos (RA). Los núcleos de las células mioides peritubulares muestran una evidente inmunotinción de RA.
- b)** Tubo seminífero con luz dilatada e hipoespermatogénesis moderada. Las células de Sertoli expresan intensamente el RA, incluso en el segmento del epitelio tubular con ausencia completa de células germinales.
- c)** Variable expresión de la intensidad de inmunotinción del RA en las células de Sertoli, algunas de las cuales sólo presentan vestigios de inmunomarcaje. En el intersticio, se ven nidos de células de Leydig, las cuales pueden ser tanto positivas como negativas para el RA.
- d)** La intensidad de inmunotinción del RA en los núcleos de las células de Sertoli es idéntica a la de las células mioides peritubulares. Las células del epitelio germinal carecen de inmunomarcaje del RA.
- e)** La inmunotinción nuclear del RA de las células de Sertoli es variable, pero permite delimitar el compartimento basal del compartimento adluminal del tubo seminífero.
- f y g)** Atrofia del epitelio seminífero con robusto inmunomarcaje del RA en los núcleos de las células de Sertoli y de las células mioides peritubulares. Algunos núcleos de células de Sertoli presentan aspecto apoptótico, pero algunos de éstos aún conservan expresión del RA.

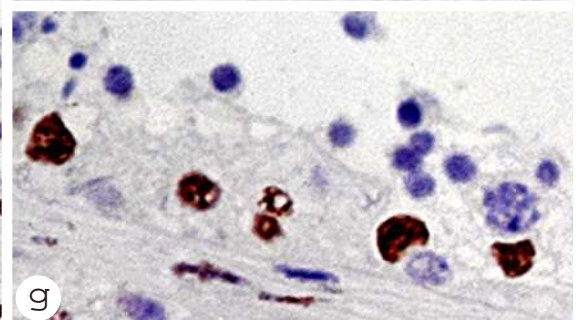
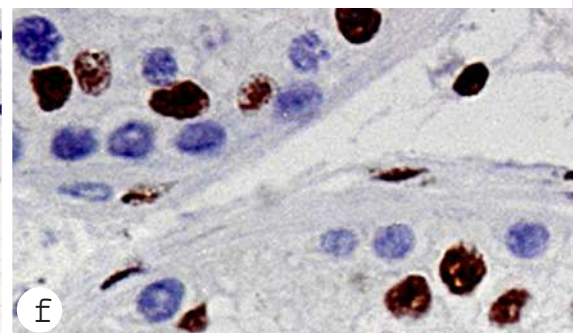
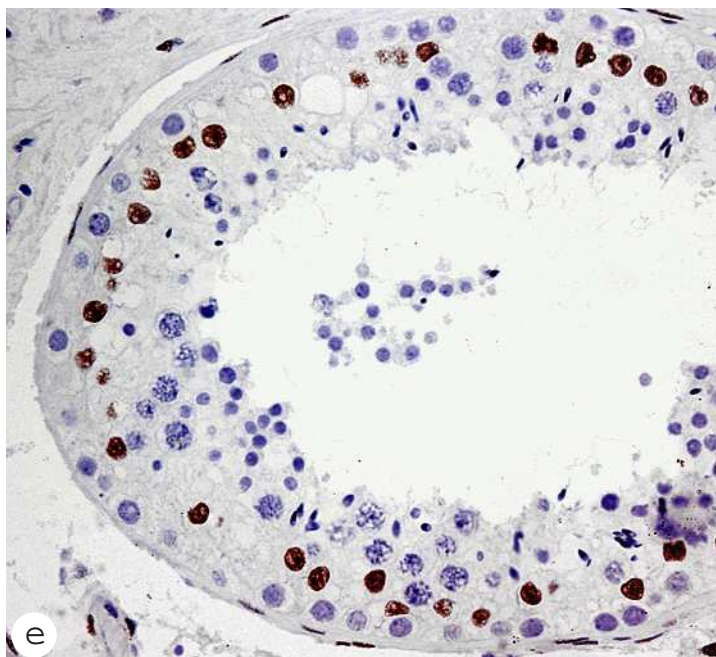
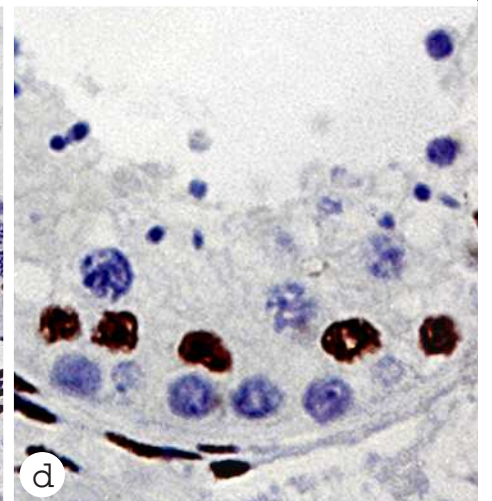
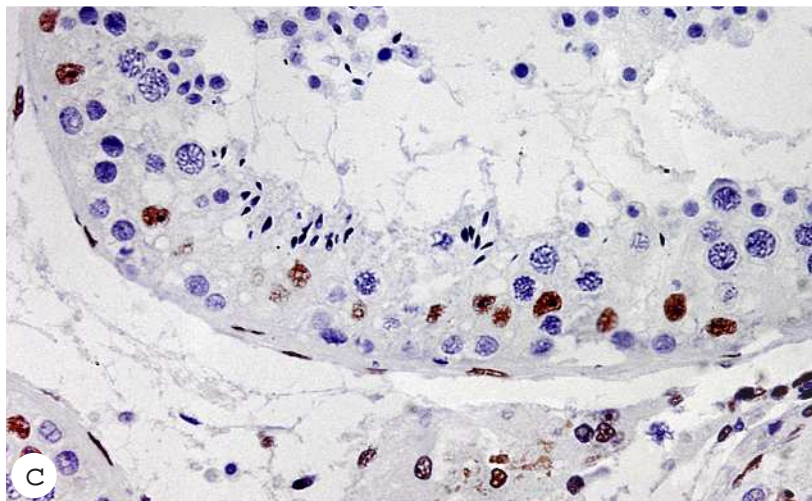
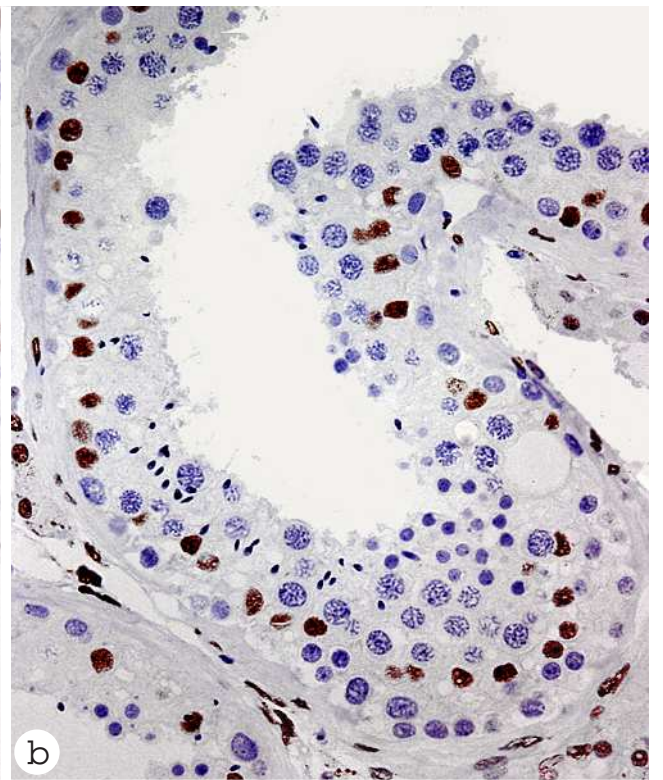
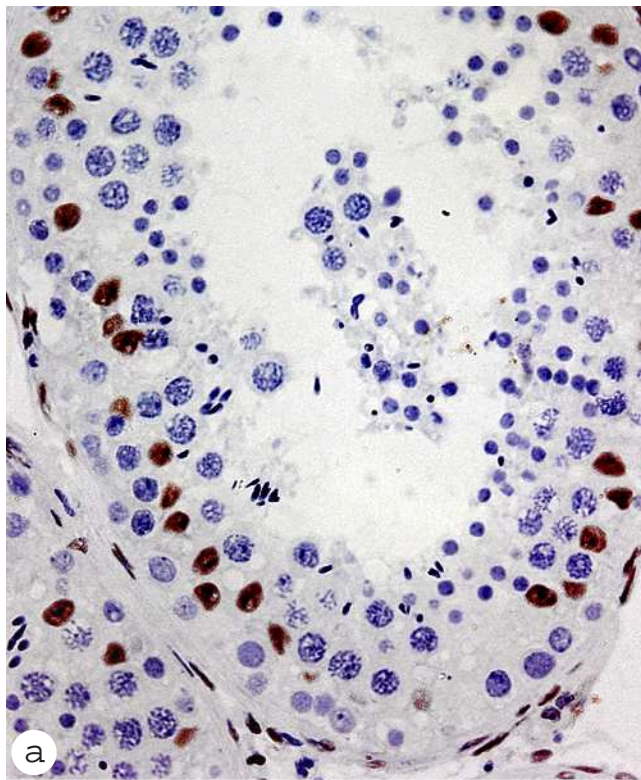


Fig. 13. Expresión del receptor de andrógenos en el testículo criptorquídico postpuberal

- a)** Tubo seminífero atrófico con un patrón de solo Sertoli. La intensidad de expresión del RA intranuclear en las células de Sertoli es variable. Las células de Leydig intersticiales dispuestas aisladamente expresan RA en el núcleo, mientras que la mayoría de las células de Leydig hiperplásicas adyacentes al tubo carecen de RA.
- b)** Conservación de la espermatogénesis en un testículo criptorquídico. Las células de Leydig peritubulares presentan una tenue expresión de RA, si se comparan con el robusto marcaje del RA en los núcleos de las células de Sertoli.
- c)** Patrón de solo Sertoli en tubos atróficos con una moderada intensidad de RA. Las células de Leydig adyacentes muestran todo un espectro de inmunotinción del RA.
- d)** Múltiples cúmulos de células de Leydig con baja expresión del RA, como corresponde a las células de Leydig disgenéticas. Algunos núcleos son rigurosamente negativos.
- e y f)** Células de Leydig atrapadas en el interior de tubos seminíferos, la mayoría de las cuales son negativas para el RA. Las células mioides constantemente son positivas para el RA.
- g y h)** Hiperplasia nodular de células de Leydig con variable intensidad del RA. La mayoría de las células de Leydig carecen de inmunotinción. Las células de Sertoli también tienen escasa tinción de RA.

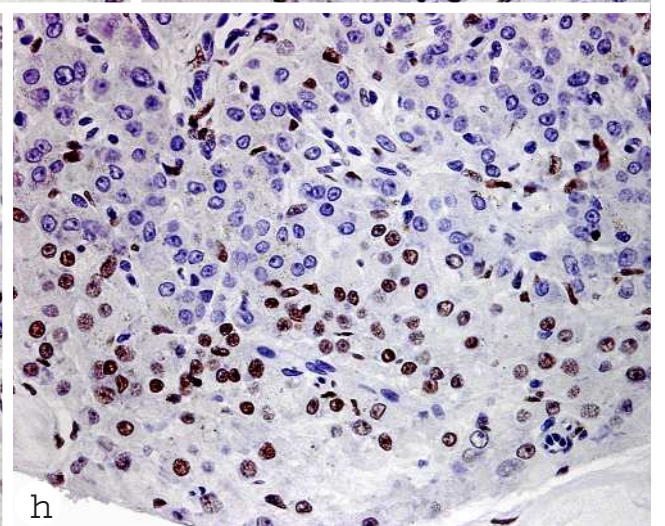
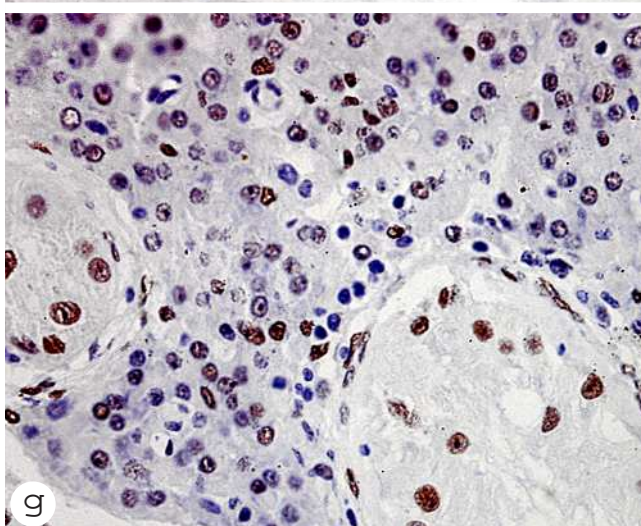
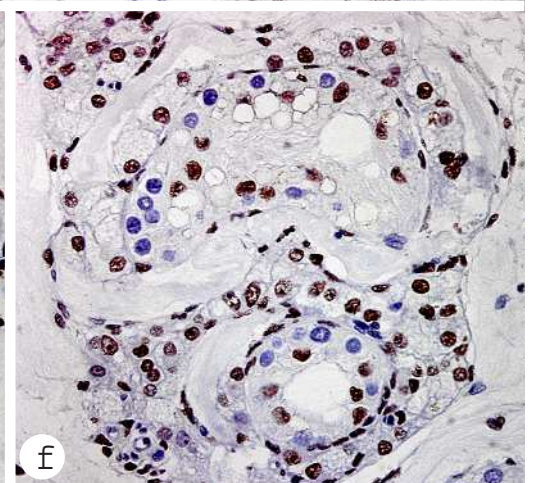
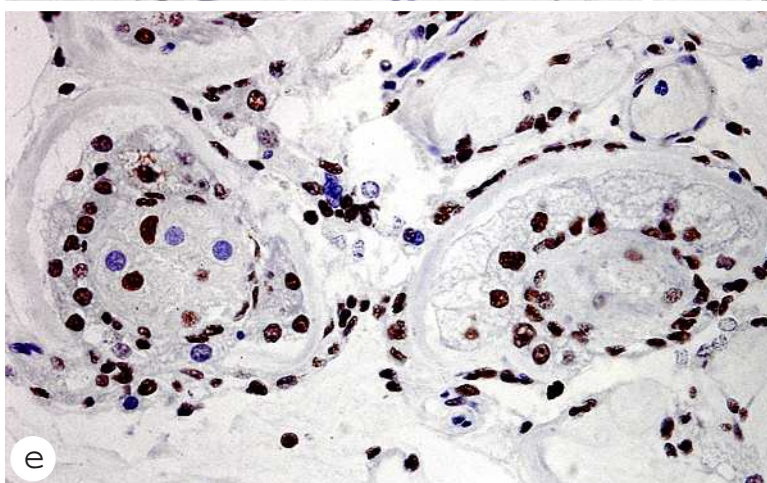
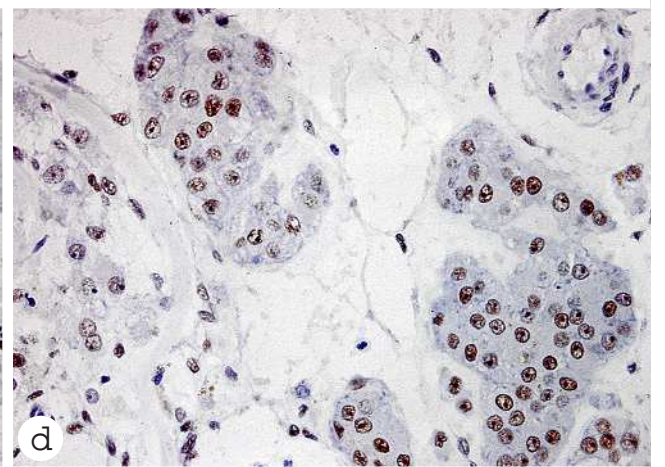
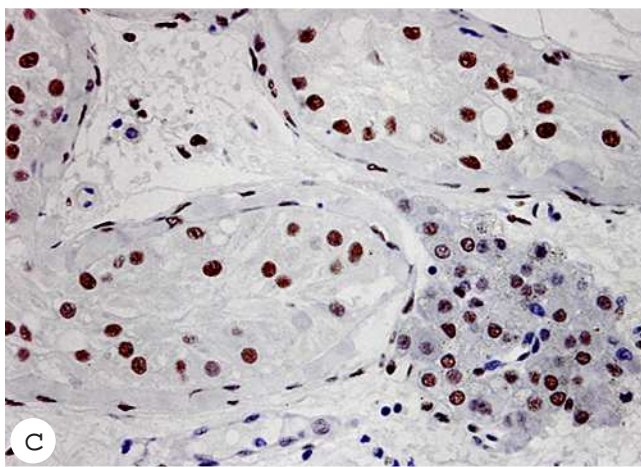
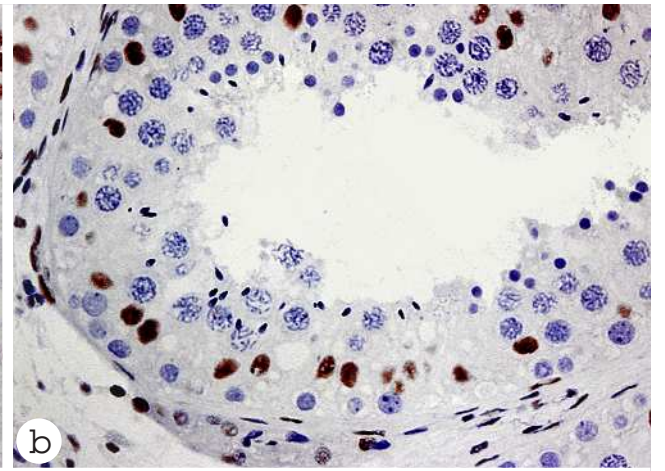
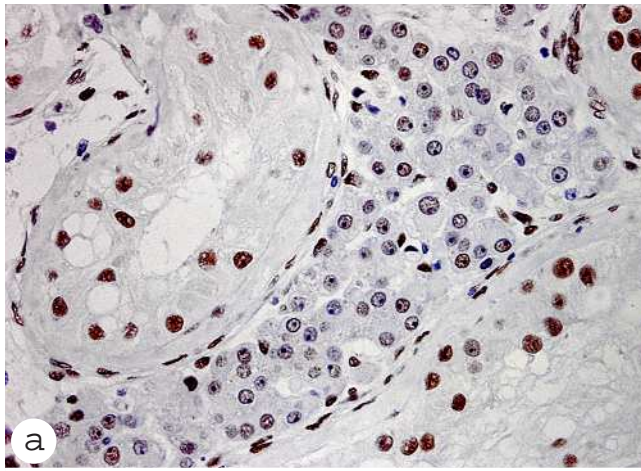


Fig. 14. Expresión del receptor de andrógenos en el testículo criptorquídico postpuberal

- a) Tubo seminífero tortuoso con un patrón de solo Sertoli con signos disgenéticos (caracterizados por ausencia de luz y núcleos elongados o redondos). Los núcleos presentan moderada tinción del RA. Algunas células de Leydig del intersticio son positivas para el RA, y otras, negativas.
- b) Tubo parcialmente hialinizado con células de Sertoli disgenéticas. La mayoría de los núcleos carecen de inmunotinción del RA.
- c) Moderada expresión del RA en las células de Sertoli en un tubo con patrón de solo Sertoli, y en las células de Leydig adyacentes.
- d) Tubo atrófico con hiperplasia de células de Sertoli. La mayoría de estas células carecen de RA.
- e) Tubo intensamente disgenético con células de Sertoli inmaduras, las cuales carecen de expresión del RA; adyacentemente, se observa un tubo con células de Sertoli disgenéticas, de contorno oval o redondo y cuyos núcleos muestran una tenue inmunoexpresión del RA.
- f) Secciones tubulares transversales y longitudinales posiblemente del mismo lobulillo que presentan células de Sertoli pseudoestratificadas con núcleos elongados, las cuales son negativas o presentan mínima expresión de RA. Algunas células de Leydig poligonales o vacuoladas muestran débil tinción nuclear del RA.

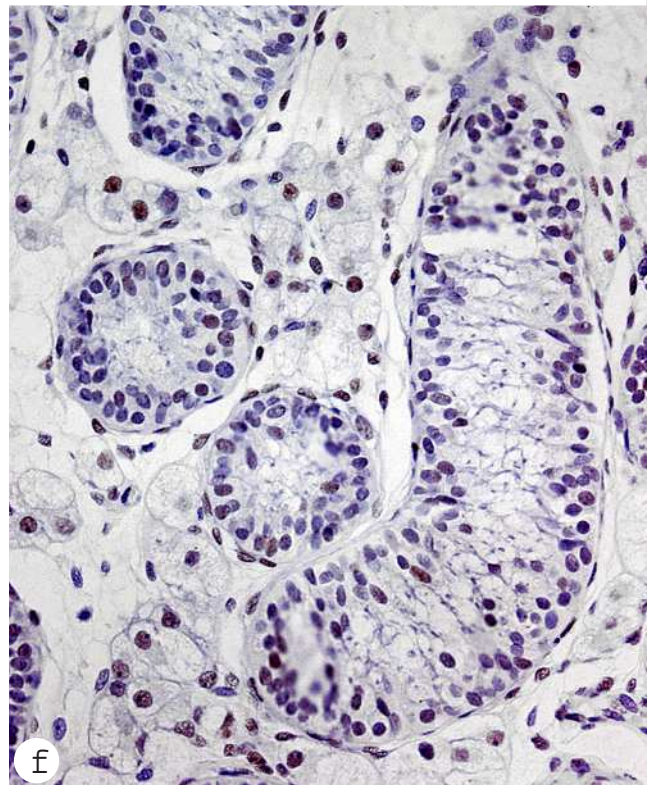
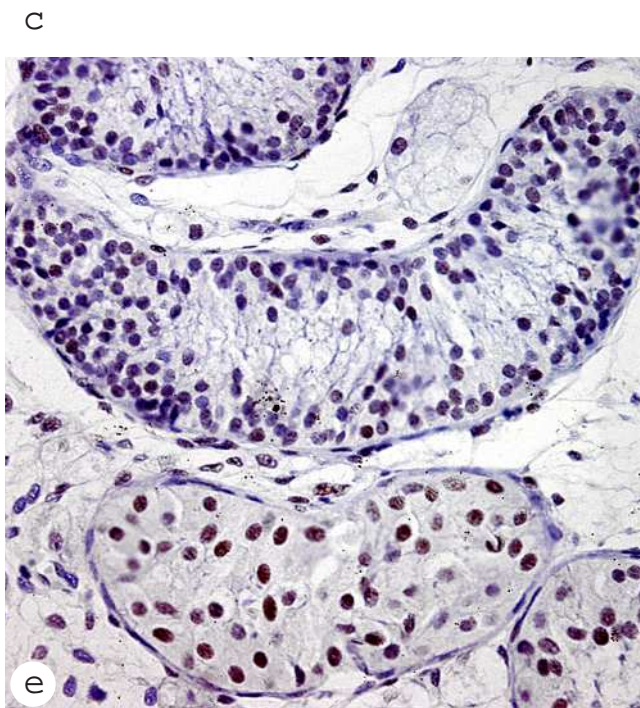
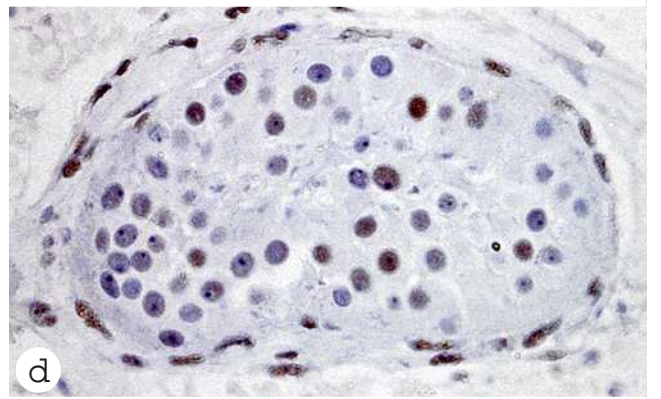
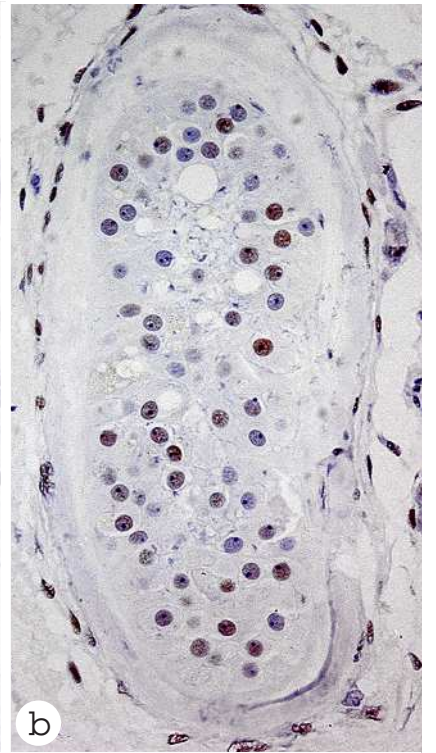
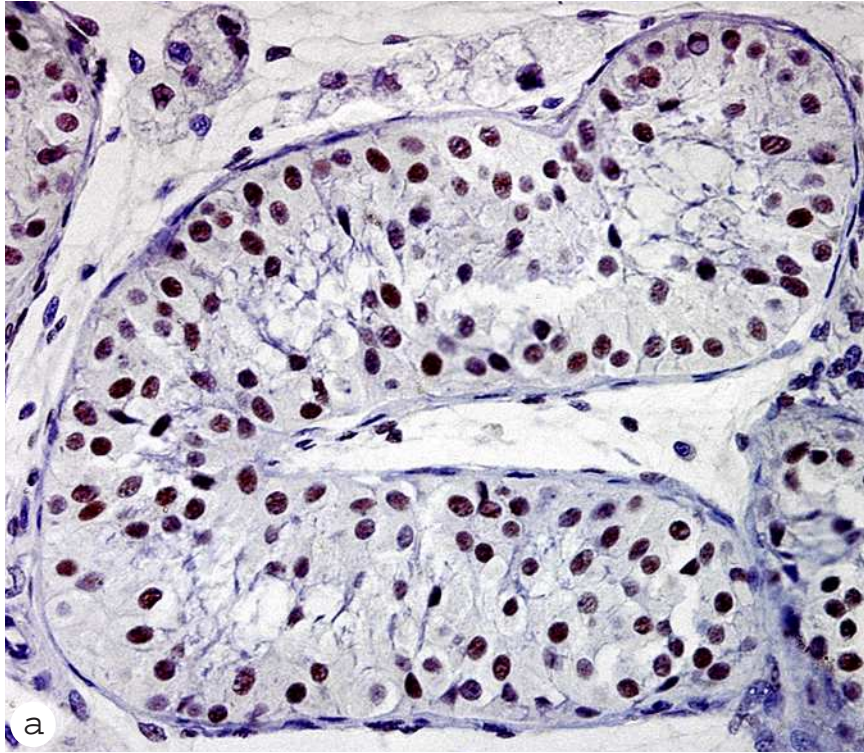


Fig. 15. Expresión del receptor de andrógenos en el testículo criptorquídico infantil

- a)** Imagen panorámica de un testículo criptorquídico infantil en el que destaca la expresión de RA en la mayoría de las células del intersticio. Las células de Sertoli son negativas.
- b)** Parénquima testicular con conservación parcial de la línea germinal. La mayoría de las células de Sertoli son negativas para el RA, mientras que las células del intersticio presentan una fuerte inmunotinción.
- c)** Detalle del caso anterior en el que sólo una célula de Sertoli expresa el RA.
- d)** Tubos seminíferos de pequeño diámetro con elevado número de células por sección tubular. El intersticio está ampliado. Destaca la intensa expresión del RA en las células de Leydig; mientras que la mayoría de las células de Sertoli son negativas.
- e y f)** Ambas imágenes corresponden al mismo caso en el que los tubos seminíferos son disgenéticos, contiene células de Sertoli inmaduras de núcleo redondo, las cuales carecen de RA. En el intersticio es muy llamativa la intensa expresión de RA en los núcleos de las células peritubulares y de las células de Leydig.

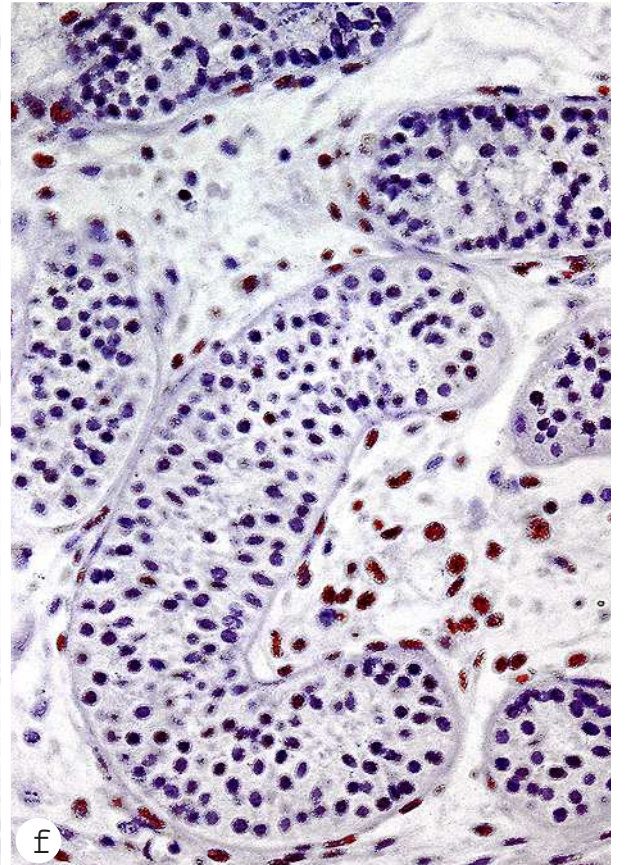
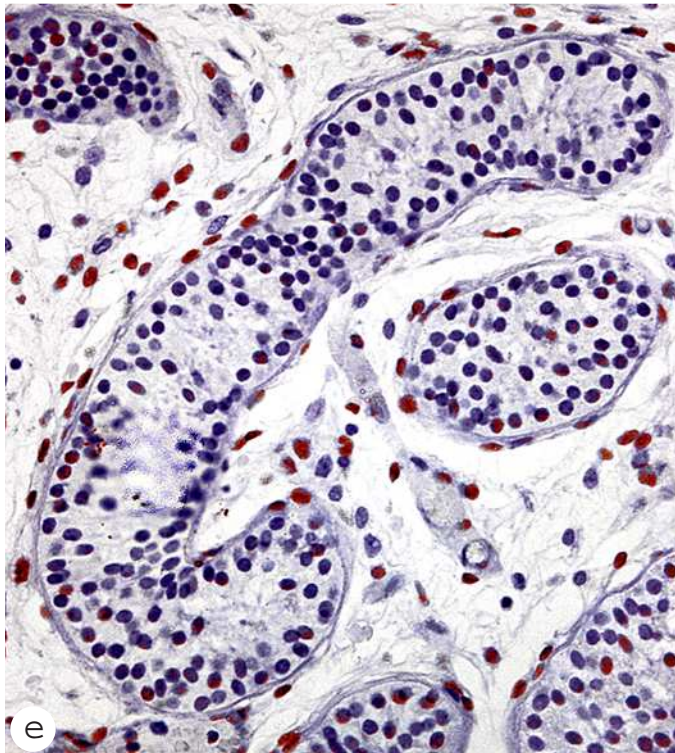
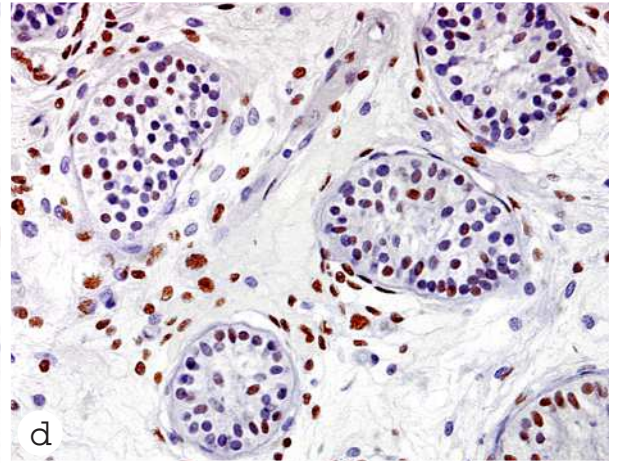
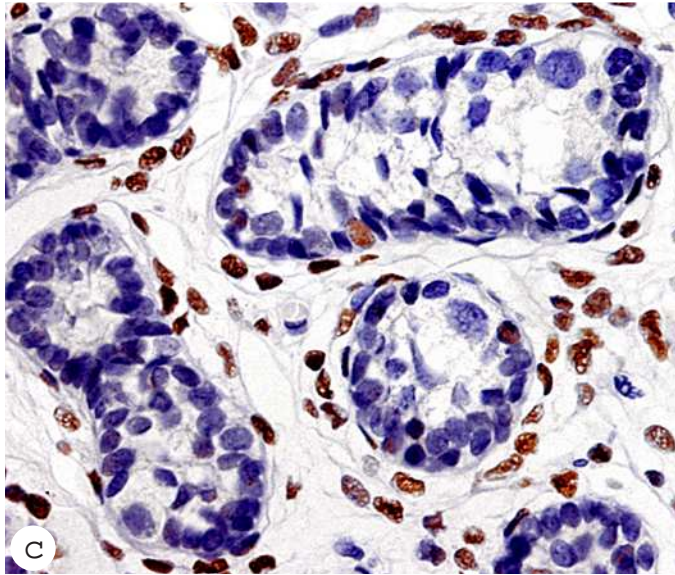
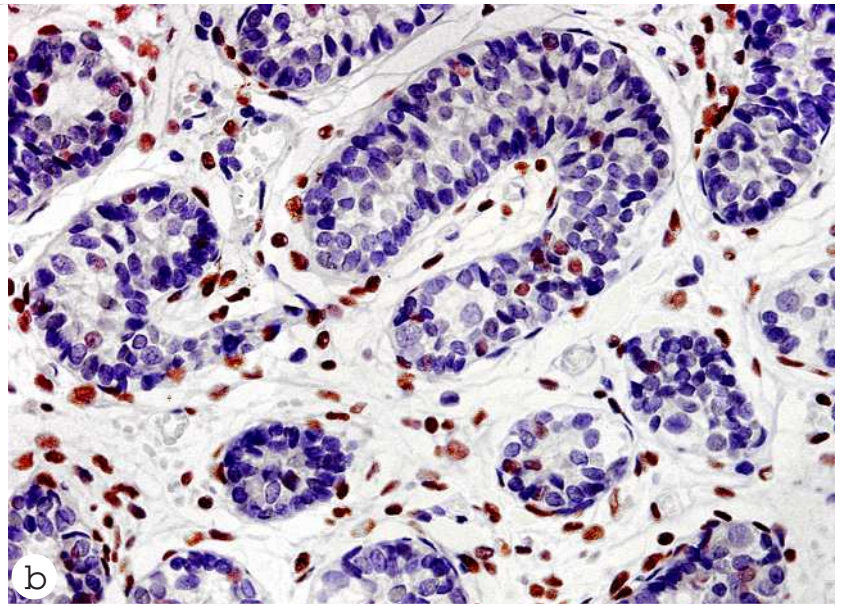
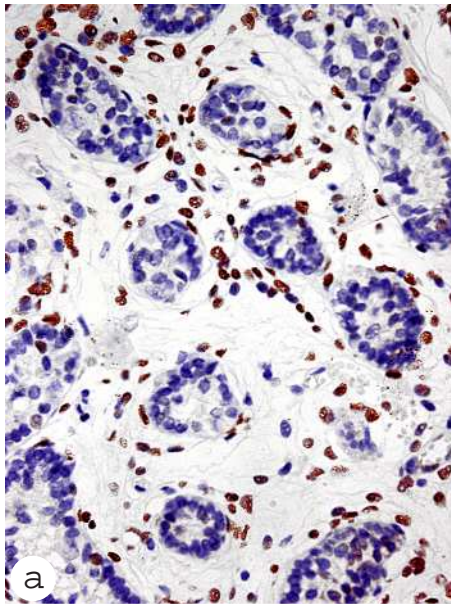
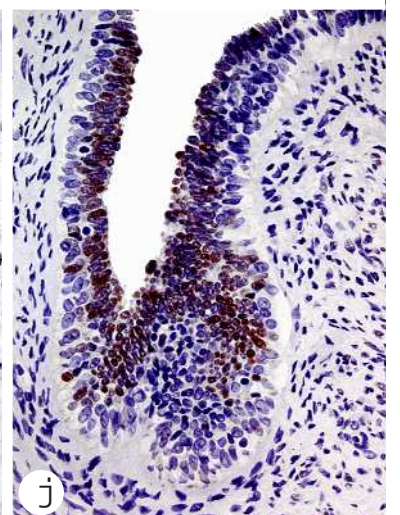
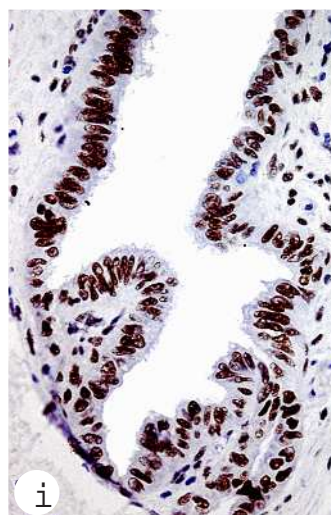
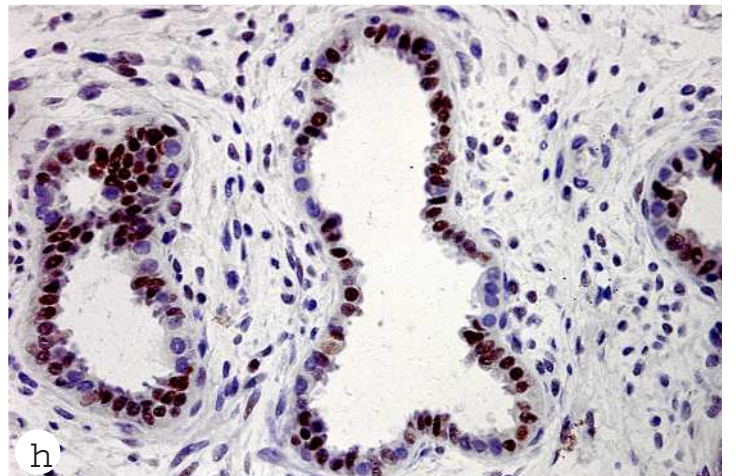
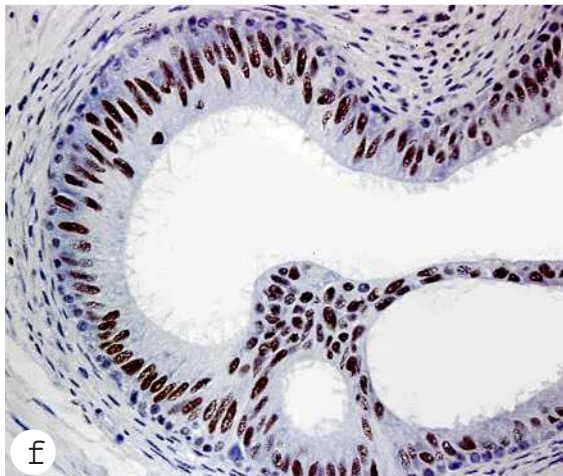
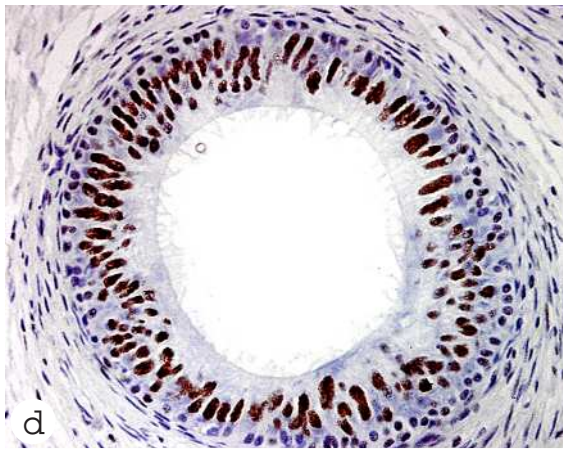
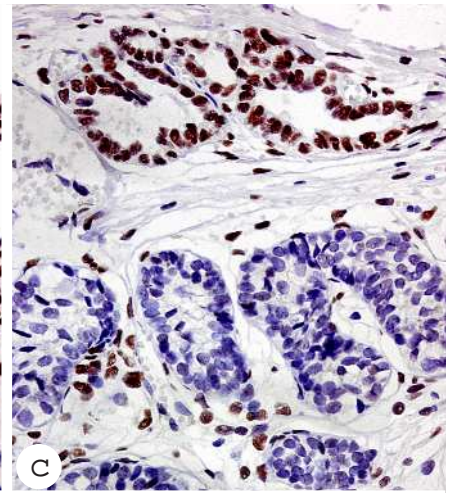
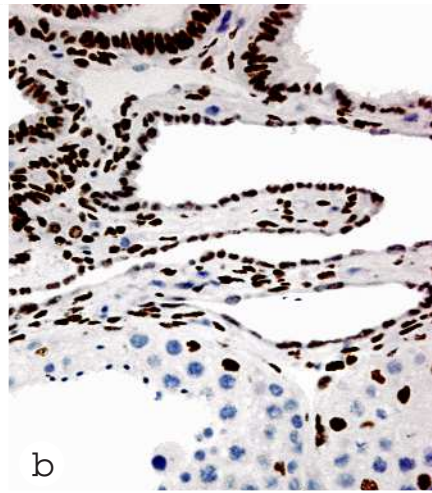
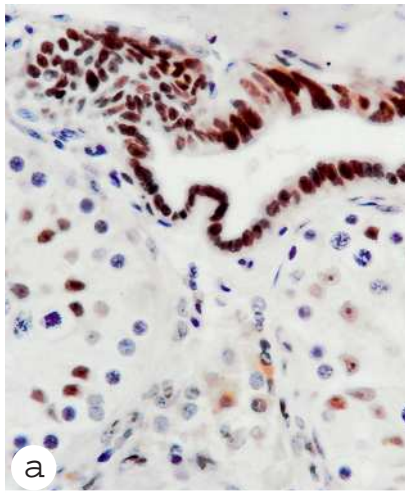


Fig. 16. Expresión del receptor de andrógenos en la vía espermática del hombre normal y de los pacientes pre y postpuberales con criptorquidia

- a) Testículo de un hombre adulto normal. Intenso inmunomarcaje del RA en los núcleos del epitelio cúbico de la *rete testis*, si se compara con la menor inmunotinción de los núcleos de las células de Sertoli y de la células de Leydig.
- b) La *rete testis* está dilatada, sus células columnares y las escamosas tienen una intensa expresión de RA. Se ve ligera disminución de la línea germinal, y las células de Sertoli y las mioides muestra RA. Testículo de un hombre adulto normal de edad avanzada.
- c) Niño con criptorquidia e intenso marcaje de RA en los núcleos de la *rete testis*, siendo tenue en las células mioides y ausencia en las células de Sertoli.
- d) Sección transversal del conducto propio del epidídimo de un hombre normal. Las células principales del epidídimo muestran expresión del RA, y también se ve en algunas células basales. Igualmente, los leiomiocitos expresan el RA, aunque con menor intensidad.
- e) Sección oblicua del conducto epididimario. Se observa la formación de una pseudoglándula intraepitelial en la que sus células presentan una variable intensidad del RA, si se compara con la intensa expresión del epitelio epididimario normal.
- f y g) Múltiples pseudoglándulas (“pitts”) del epitelio del epidídimo. Dado que su pared contiene muchas células basales, la expresión del RA es menor, con respecto a la de las células principales del epidídimo. Solo algunos leiomiocitos expresan RA y siempre con tenue intensidad.
- h) Epidídimo de una criptorquidia infantil con epitelio atrófico, en el que se alterna una presenta intensa expresión de RA en algunas células epiteliales, con otras que carecen de RA.
- i) Sección oblicua del conducto epididimario de un niño normal. Obsérvese una constante e intensa tinción de RA en todas las células epiteliales.
- j) Sección oblicua del epidídimo de un niño prepuberal con criptorquidia. Se ven numerosas células basales carentes de expresión del AR, el cual se conserva con intensa actividad en las células principales.



EVALUACIÓN MICRODENSITOMÉTRICA DE LA EXPRESIÓN INMUNO-HISTOQUÍMICA DE INHIBINA B EN LAS CÉLULAS DE SERTOLI NORMALES

En cada estadio madurativo del epitelio seminífero, también se ha cuantificado la intensidad del color marrón de inmunomarcaje con el anticuerpo anti-Inhibina B, marcaje revelado con diaminobencidina. El color del cromógeno se evalúa mediante los canales rojo y verde, de cuya mezcla surgen los diferentes marrones, mientras que el valor del canal azul estaría más en relación con la intensidad de la contratinción nuclear de los ácidos nucleicos, obtenida con el empleo del colorante ácido, la hematoxilina (Tabla 2).

Tabla 2. Cuantificación microdensitométrica (canales rojo, verde y azul) de la intensidad de inmunotinción de Inhibina B en las células de Sertoli en 22 tubos seminíferos de casos con espermatogénesis normal.

Objeto	Rojo	Verde	Azul
1	151,0	104,3	79,0
2	157,8	121,1	104,9
3	162,2	127,4	105,1
4	153	106,2	85,4
5	161,5	109,8	90,7
6	156,2	126,3	93,2
7	160,4	125,6	102,6
8	155,5	115,5	81,3
9	156,7	117,8	80,9
10	153,6	123,1	84,6
11	156,9	125,6	103,1
12	158,1	107,9	100,6
13	159,2	105,8	99,8
14	160,4	120,2	88,7
15	157,7	121,8	82,3
16	156,8	119,6	85,6
17	153,8	118,3	86,1
18	158,2	126,1	98,3
19	161,6	126,9	92,6
20	154,9	114,3	99,7
21	155,6	124,2	102,4
22	160,5	122,5	101,6
X ± SD	157,3 ± 3,0	118,6 ± 10,3	93,1 ± 8,7

Estos datos numéricos de los valores microdensitométricos de la intensidad de inmunomarcaje de Inhibina B quedan mejor expresados en la Figura 17 en la que se representa la proporción de tinción de la densidad óptica integrada (DOI), que como es bien conocido son valores numéricos arbitrarios (una escala de 0 a 255 dígitos).

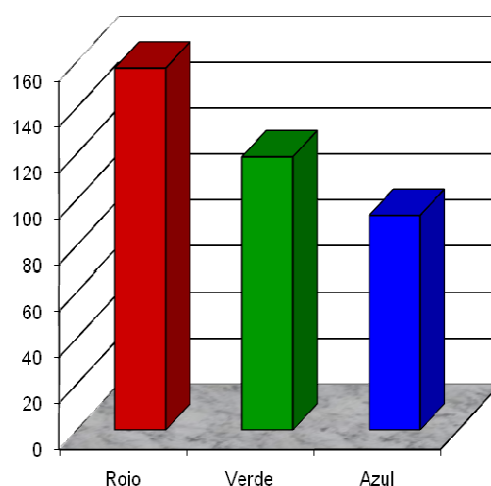


Figura 17. Proporción de la cuantificación microdensitométrica (canales rojo, verde y azul) de la expresión de Inhibina B en el citoplasma de las células de Sertoli normales, en relación con los diferentes estadios madurativos de la espermatogénesis en varones adultos normales.

Como quiera, estos valores de la DOI son inversos a la intensidad de color, esto es, inversos a la expresión del inmunomarcaje; en la Figura 18 se representan estos valores inversos de la DOI de la inmunoexpresión de Inhibina B.

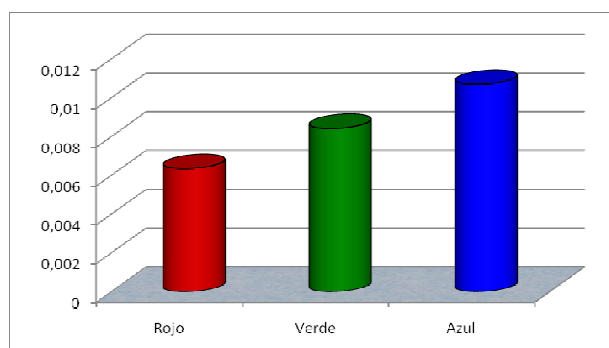


Figura 18. Valor inverso de la cuantificación microdensitométrica, el cual es proporcional a la intensidad de expresión de Inhibina B en el citoplasma de las células de Sertoli normales.

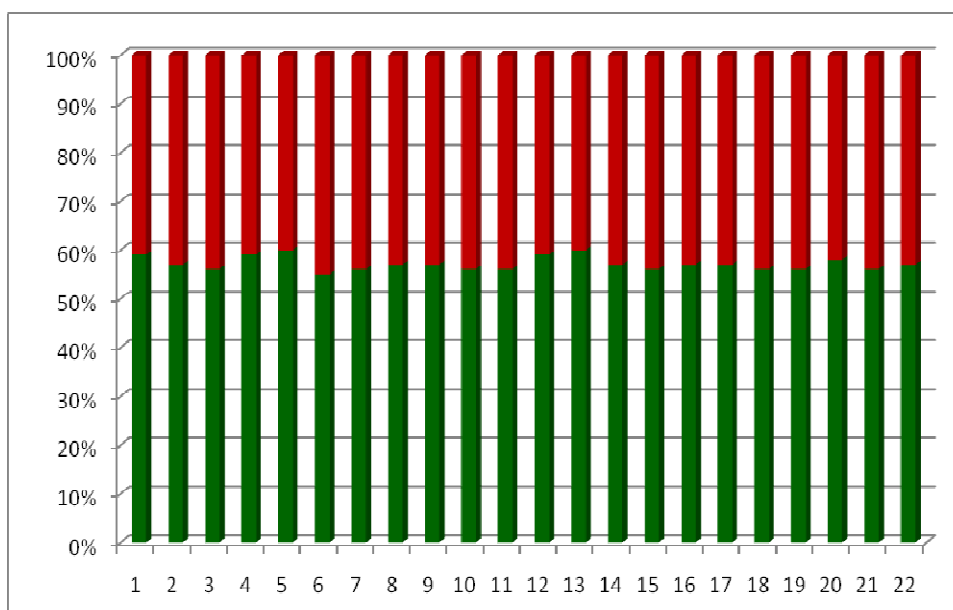


Figura 19. Histograma resultante de la cuantificación de los valores inversos de DOI de Inhibina B de las células de Sertoli, obtenidos microdensitométricamente en los 22 tubos evaluados con espermatogénesis normal. Apréciase que la proporción de los canales rojo y verde es bastante semejante, siendo las variaciones encontradas poco importantes y sólo relacionadas con las peculiaridades de los diferentes estadios madurativos de la espermatogénesis.

En definitiva, de este modo podemos observar que la intensidad de expresión de Inhibina B del citoplasma de las células de Sertoli no presenta una notoria dispersión en los diferentes estadios madurativos de la espermatogénesis normal (Figura 19), incluso en aquellos segmentos del tubo seminífero en los que el estado del ciclo celular aun se encuentra en la fase de divisiones mitóticas (estado madurativo constituido exclusivamente por espermatogonias y células de Sertoli) previas a los procesos de formación de espermatocitos de 1^{er} orden, y de procesos meióticos y postmeióticos.

COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE INHIBINA B EN EL TESTÍCULO DEL HOMBRE ADULTO Y ANCIANO NORMALES Y DE LOS PACIENTES CON CRIPTORQUIDIA

Cuantificación Microdensitométrica de la Expresión de Inhibina B en las Células de Sertoli Normales y de Pacientes con Criptorquidia

Tabla 3. Mediciones densitométricas de la Densidad Óptica Integrada (DOI de cada uno de los tres canales de color) de la inmunexpresión de inhibina B en las células de Sertoli.

Inhibina B en Células de Sertoli	ROJO X ± SD	VERDE X ± SD	AZUL X ± SD
Adulto normal	87 ± 17	53 ± 10	69 ± 8
Anciano normal	130 ± 16	100 ± 21	86 ± 19
Adulto con criptorquidia	163 ± 24	147 ± 35	136 ± 38
Niño con criptorquidia	155 ± 17	136 ± 20	123 ± 24
ANOVA	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

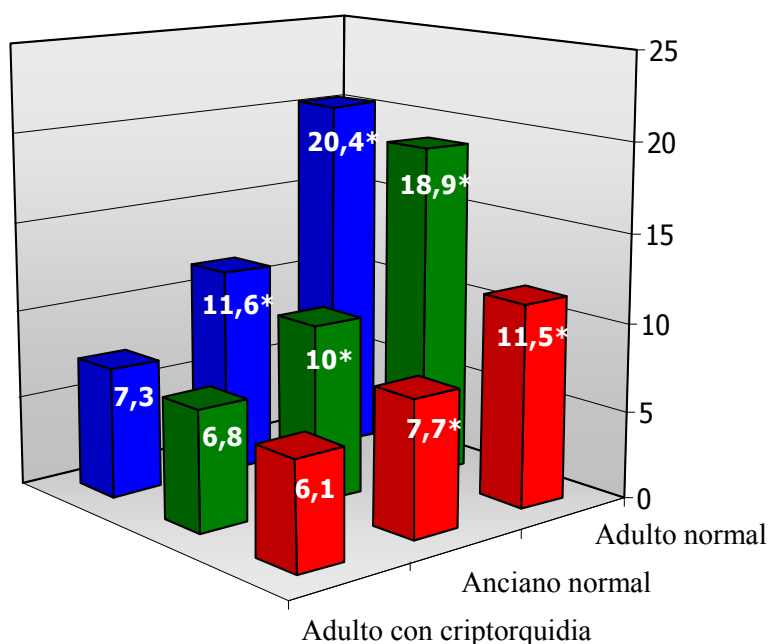


Figura 20. Comparación densitométrica de inhibina B en células de Sertoli de adultos normales, ancianos normales y adultos con criptorquidia. Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} . * $P < 0,0001$ (ANOVA)

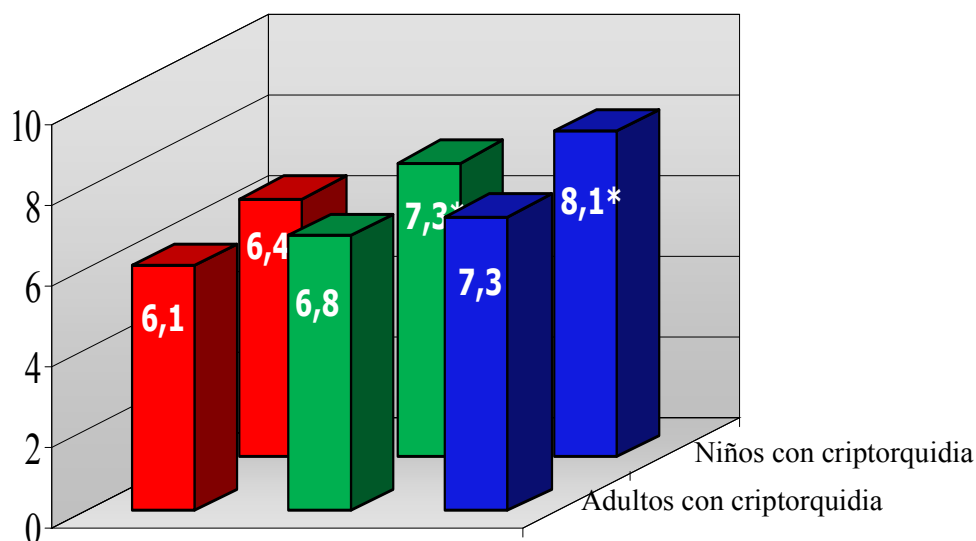


Figura 21. Comparación densitométrica de inhibina B en células de Sertoli de adultos y niños con criptorquidia. Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} . * $P < 0.0001$ (t Student)

Cuantificación Microdensitométrica de la Expresión de Inhibina B en las Células de Leydig Normales y de Pacientes con Criptorquidia.

Tabla 4. Mediciones densitométricas de la Densidad Óptica Integrada (DOI de cada uno de los tres canales de color) de la inmunoexpresión de inhibina B en células intersticiales.

Inhibina B en Células Intersticiales	ROJO X \pm SD	VERDE X \pm SD	AZUL X \pm SD
Adulto normal	92 \pm 12	54 \pm 10	50 \pm 7
Anciano normal	123 \pm 20	91 \pm 24	80 \pm 22
Adulto con criptorquidia	163 \pm 12	152 \pm 17	143 \pm 18
Niño con criptorquidia	130 \pm 20	101 \pm 26	92 \pm 25
ANOVA	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

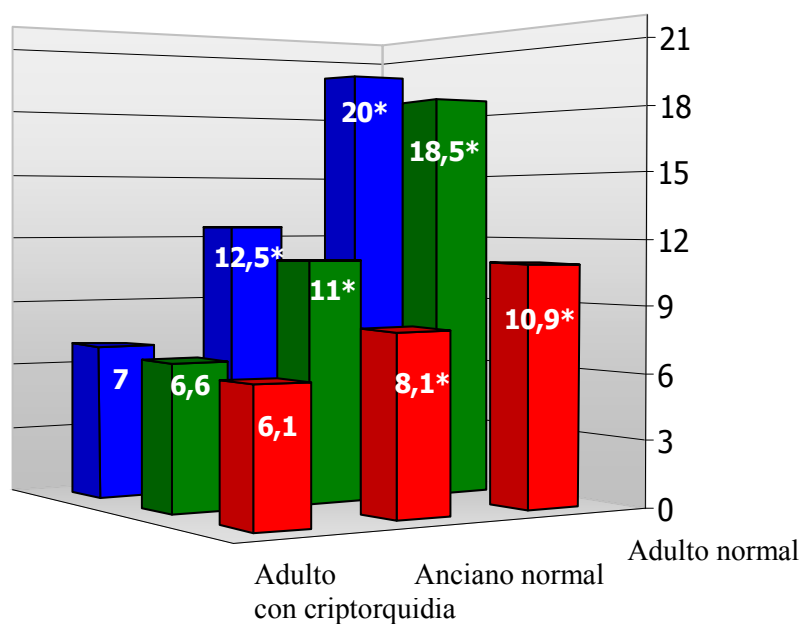


Figura 22. Comparación densitométrica de inhibina B en células intersticiales de adultos normales, ancianos normales y adultos con criptorquidia. Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} . $P < 0.0001$ (ANOVA).

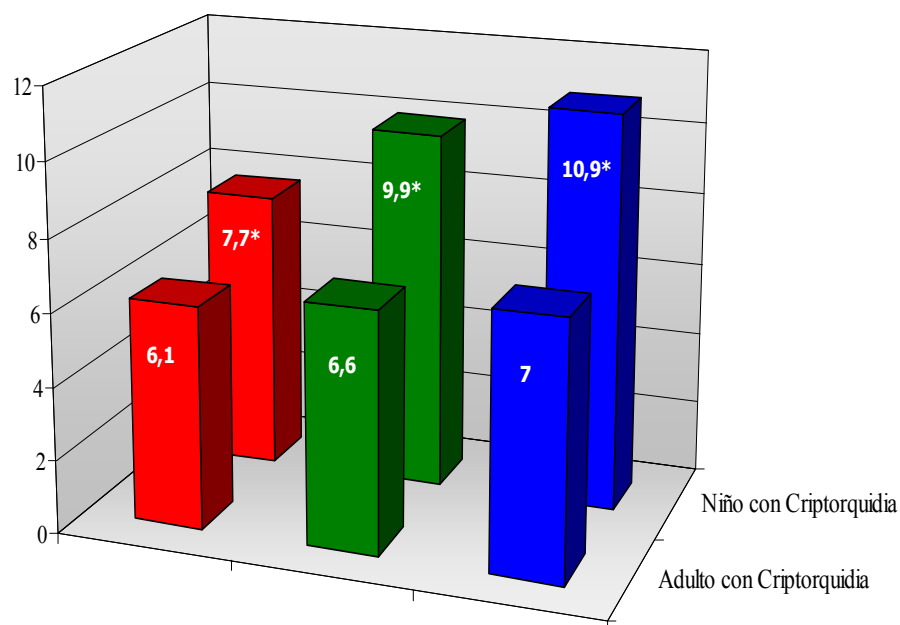


Figura 23. Comparación densitométrica de inhibina B en células intersticiales de adultos y niños con criptorquidia. Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} . * $P < 0.0001$ (t Student).

Comparación de Inhibina B entre Testículo y Vía Espermática

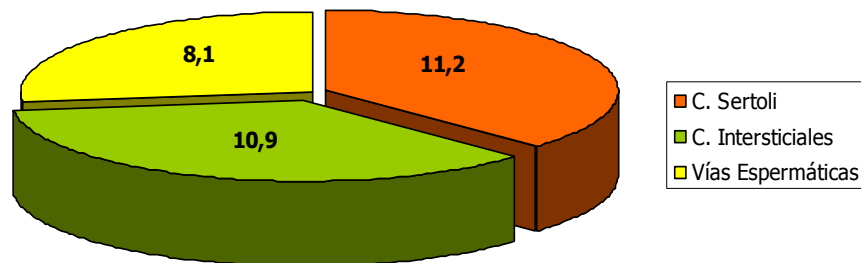


Figura 24. Comparación densitométrica de inhibina B, color rojo, en células del testículo de adultos normales. C. Sertoli vs C. Intersticiales $p = 0,016$; C. Sertoli vs Vías Espermáticas $p < 0,0001$; C. Intersticiales vs Vías Espermáticas $p < 0,0001$. Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} .

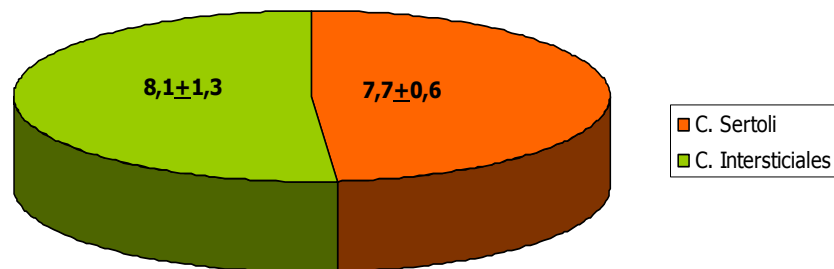


Figura 25. Comparación densitométrica de inhibina B, color rojo, en células del testículo de ancianos normales. $P < 0,0001$. Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} .

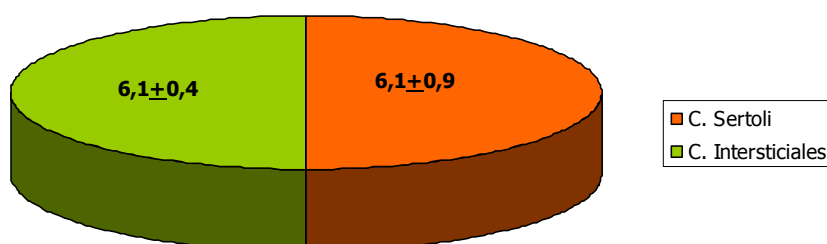


Figura 26. Comparación densitométrica de inhibina B, color rojo, en células del testículo de adultos con criptorquidia. Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} .

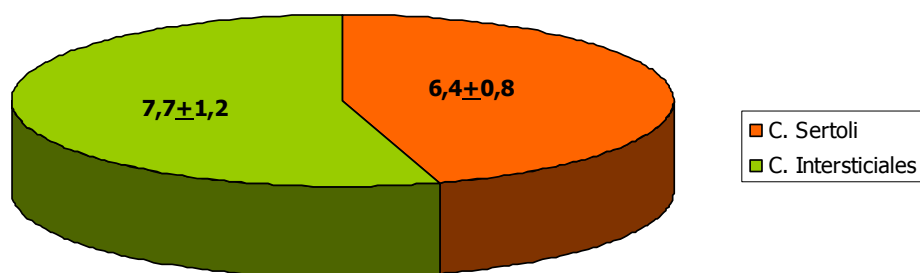


Figura 27. Comparación densitométrica de inhibina B, color rojo, en células del testículo de niños con criptorquidia. $P < 0.0001$. Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} .

COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN EL TESTÍCULO DEL HOMBRE ADULTO Y ANCIANO NORMALES Y DE LOS PACIENTES CON CRIPTORQUIDIA

Cuantificación Microdensitométrica de la Expresión del Receptor de Andrógenos (RA) en las Células de Sertoli Normales y de Pacientes con Criptorquidia

Tabla 5. Mediciones densitométricas de la Densidad Óptica Integrada (DOI de cada uno de los tres canales de color) de la inmunoexpresión del RA en células de Sertoli.

Receptor de Andrógenos en Células de Sertoli	ROJO X ± SD	VERDE X ± SD	AZUL X ± SD
Adulto normal	103 ± 11*	75 ± 12*	70 ± 11*
Anciano normal	127 ± 11	106 ± 11	107 ± 10*
Adulto con criptorquidia	131 ± 15	116 ± 18	124 ± 18*
Niño con criptorquidia	132 ± 9	119 ± 9	134 ± 14*
ANOVA	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

*Post Hoc diferentes a los demás

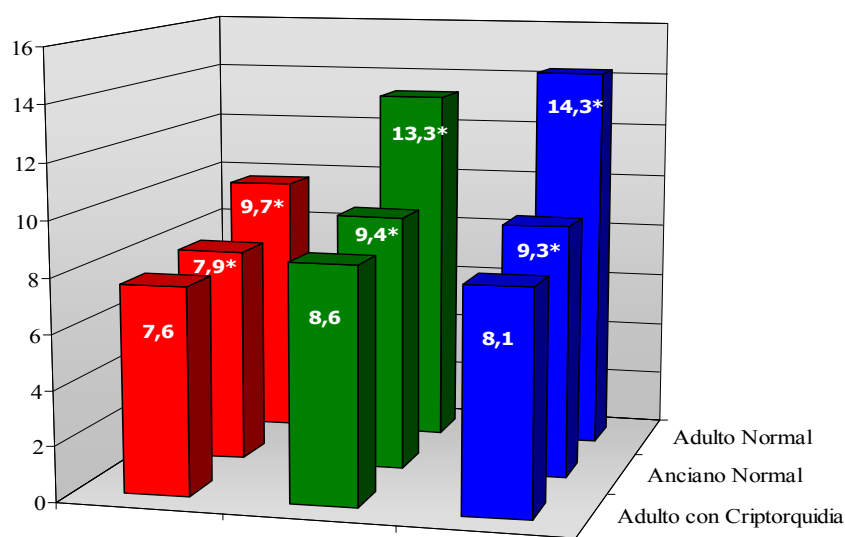


Figura 28. Comparación densitométrica del RA en células de Sertoli de adultos, ancianos normales y adultos con criptorquidia. Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} . * $p < 0.0001$ (ANOVA).

Cuantificación Microdensitométrica de la Expresión del RA en las Células Intersticiales Normales y de Pacientes con Criptorquidia

Tabla 6. Mediciones densitométricas de la Densidad Óptica Integrada (DOI de cada uno de los tres canales de color) de la inmunoexpresión del RA en células intersticiales.

Receptor de Andrógenos en Células Intersticiales	ROJO X ± SD	VERDE X ± SD	AZUL X ± SD
Adulto normal	103 ± 12	77 ± 14	75 ± 14
Anciano normal	127 ± 18	109 ± 21	116 ± 23
Adulto con criptorquidia	142 ± 18	124 ± 18	126 ± 17
Niño con criptorquidia	118 ± 14	96 ± 15	100 ± 15
ANOVA	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

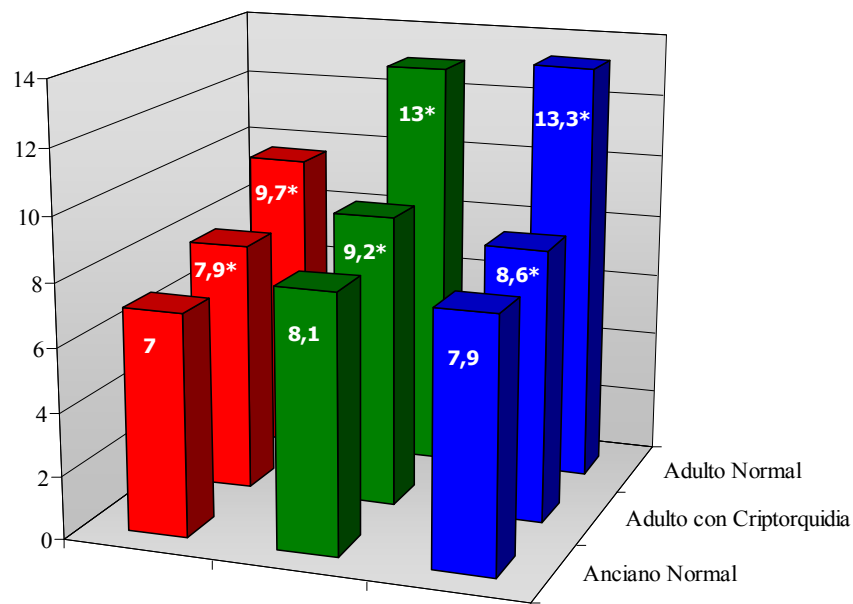


Figura 29. Comparación densitométrica del RA en células intersticiales de adultos normales, ancianos normales y adultos con criptorquidia. Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} . * $p < 0.0001$ (ANOVA).

Comparación del RA entre Testículo y Vía Espermática

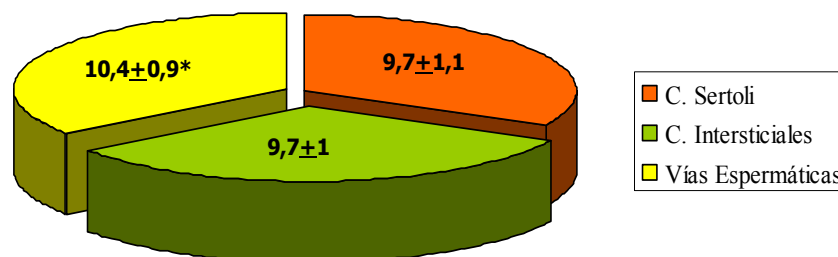


Figura 30. Comparación densitométrica del RA, color rojo, en células del testículo de hombres normales. * $p < 0.0001$. Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} .

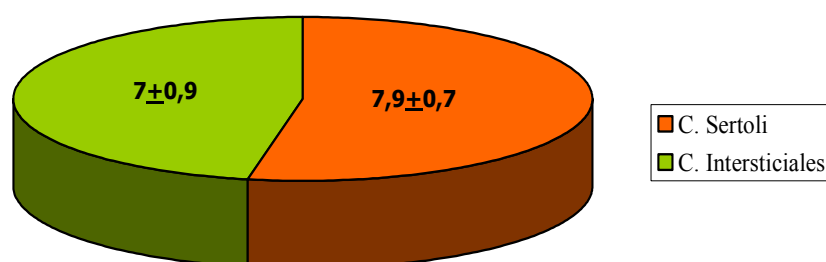


Figura 31. Comparación densitométrica del RA, color rojo, en células del testículo de hombres ancianos. Células de Sertoli vs células intersticiales $p < 0,0001$. Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} .

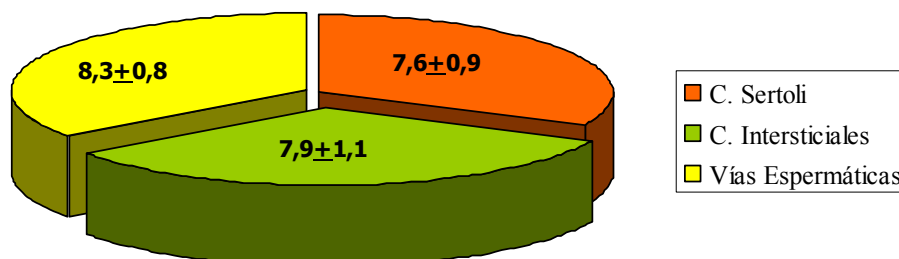


Figura 32. Comparación densitométrica del RA, color rojo, en células del testículo de hombres adultos con criptorquidia. Células de Sertoli vs células intersticiales $p < 0,003$; células de sertoli Vs vías espermáticas $p < 0.0001$; células intersticiales vs vías espermáticas $p < 0.0001$. Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} .

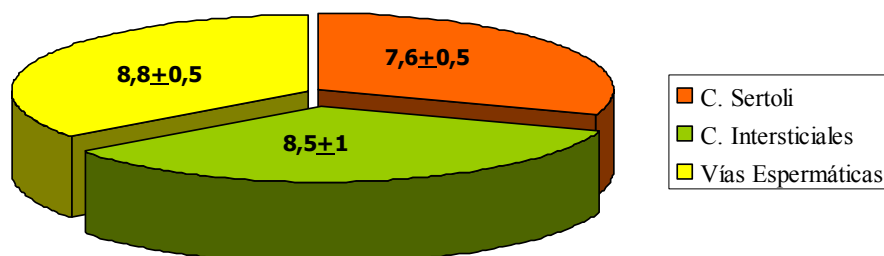


Figura 33. Comparación densitométrica del RA color rojo, en células del testículo de niños con criptorquidia. C. Sertoli vs C. Intersticiales vs Vías Espermáticas $p < 0.0001$ (ANOVA, post hoc). Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la Densidad Óptica Integrada (DOI) por 10^{-3} .

CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE INHIBINA Y LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Tabla 7. Coeficiente de correlación (DOI de cada uno de los tres canales de color) entre la expresión de inhibina B y la del RA en las células de Sertoli en todos los grupos.

Inhibina B Receptor de Andrógenos	Rojo	Verde	Azul
Rojo	0.584	0.654	0.691
Verde	0.512	0.632	0.675
Azul	0.521	0.588	0.629

Tabla 8. Coeficiente de correlación (DOI de cada uno de los tres canales de color) entre la expresión de inhibina B y la del RA en las células de Leydig en todos los grupos.

Inhibina B Receptor de Andrógenos	Rojo	Verde	Azul
Rojo	0.293	0.346	0.432
Verde	0.274	0.329	0.420
Azul	0.248	0.306	0.400

En los siguientes gráficos se incluye la dispersión de la comparación de la inhibina B y el RA, obteniéndose una baja dispersión de los datos y una recta de regresión ascendente. Con el fin de correlacionar mejor la intensidad de color de la expresión de inhibina B y RA se ha determinado el coeficiente de correlación del canal rojo, y con los datos de este canal se ha realizado la valoración de la significación estadística de dicho coeficiente de correlación en todo el conjunto de casos estudiados.

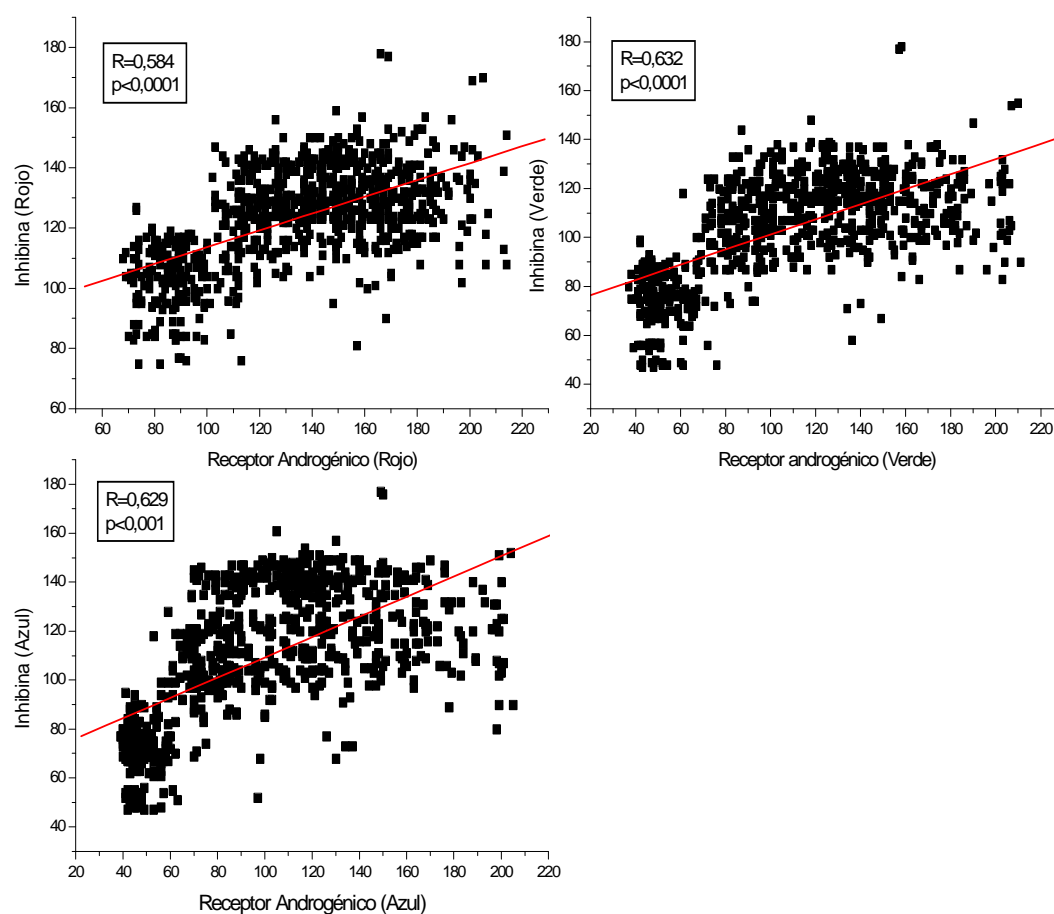


Figura 34. Relación entre inhibina B y el RA en el compartimento tubular en todos los individuos estudiados. En cada gráfico se muestra la recta de regresión obtenida, según la coloración.

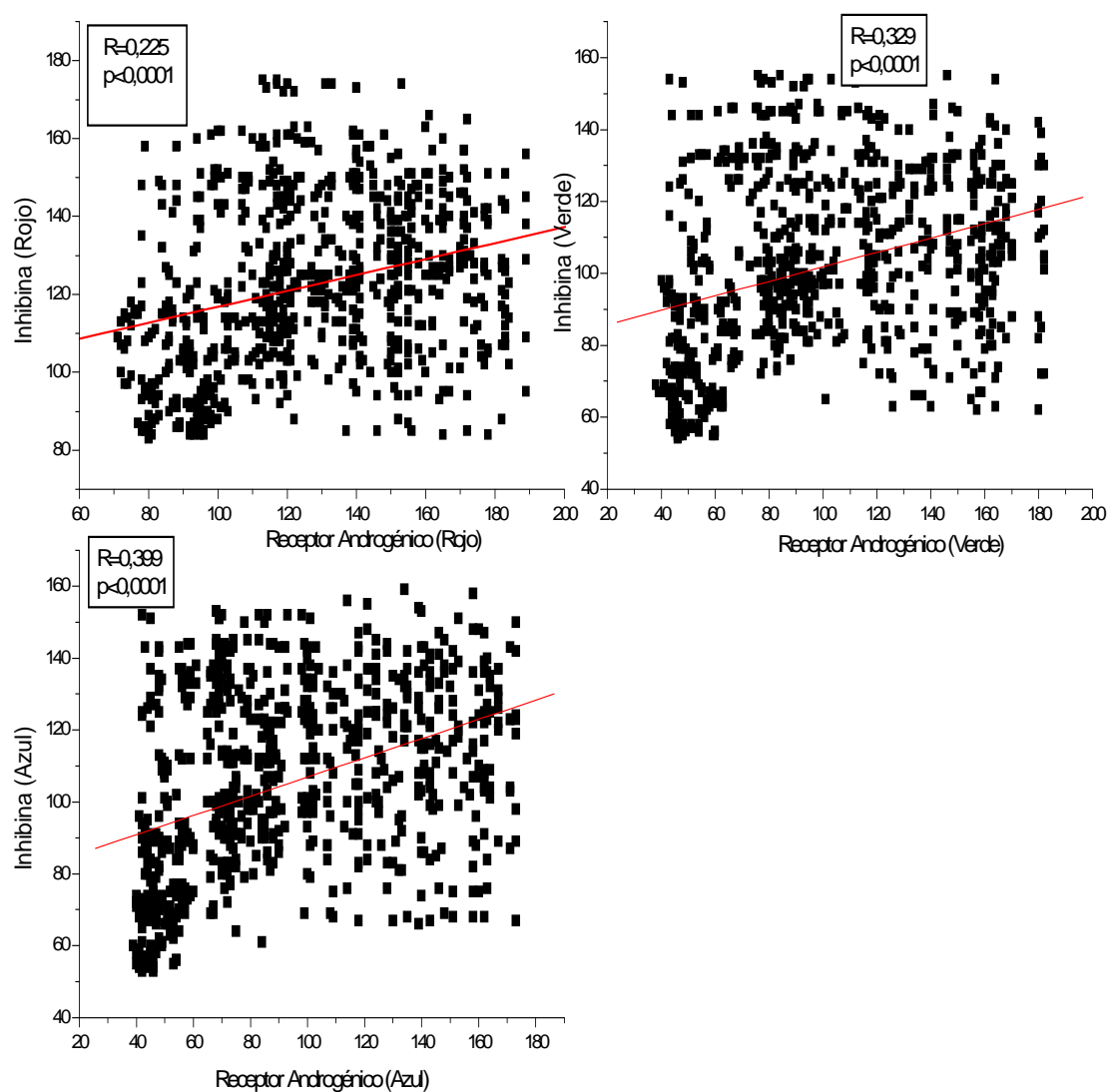


Figura 35. Relación entre inhibina B y el RA en el compartimiento de células de Leydig en todos los individuos estudiados. En cada gráfico se muestra la recta de regresión obtenida, según la coloración.

DISCUSIÓN

La presente Tesis se ha centrado en la valoración inmunohistoquímica de la Inhibina B y el receptor de andrógenos RA, en el testículo del hombre adulto normal, así como en los cambios que pudiera experimentar en relación con la progresiva atrofia tubular durante la senectud, y las lesiones primarias presentes en el testículo criptorquídico.

Está bien establecido que la espermatogénesis del hombre normal es un proceso altamente complejo regulado por la acción de las hormonas FSH, LH, testosterona y 17β -estradiol. El ciclo espermatogénico en el varón es un proceso continuo que está altamente regulado y en él participan cuatro células de la línea germinal, a saber: 1) la división de espermatogonias tipo A, que mantiene un grupo de células madre y la producción de espermatogonias tipo B, cuyo destino es desarrollarse a espermatozoides; 2) la diferenciación del espermatocito; 3) la espermiogénesis (un proceso en el cual las espermátidas son sometidas a cambios morfológicos para convertirse en espermatozoides maduros y móviles); y 4) la espermiación (que constituye la liberación de las espermátidas alargadas o espermatozoides, producto final de la espermatogénesis) en el lumen del epitelio seminífero^{99,114}

En el epitelio seminífero, donde se desarrollan las células germinales, además se encuentran las células somáticas, esto es: las células de Sertoli, las cuales proporciona apoyo nutricional y estructural al desarrollo de las células germinales. Durante la espermatogénesis, las células germinales permanecen en estrecho contacto con las células de Sertoli, lo cual es esencial para su desarrollo. El elemento crucial para estas interacciones célula-célula, en el epitelio seminífero, es la producción de varias moléculas por las células de Sertoli, tales como hormonas, factores de crecimiento, proteasas, inhibidores de la proteasa y los componentes de la matriz extracelular. En el animal adulto, las células de Sertoli actúan principalmente para promover y mantener las células germinales en desarrollo. Esto se consigue mediante la generación de un micro-entorno dentro de los tubos seminíferos, a través de la formación de una barrera de células de Sertoli y regulación del movimiento de soluto y secreción en los tubos. Existen varias publicaciones que apoyan la función directa de las células de Sertoli en el mantenimiento de la espermatogénesis.^{47,128} Además, las células de Sertoli son conocidas por contribuir a la formación de la barrera hemato-testicular, una barrera impermeable que divide el epitelio seminífero en un compartimiento basal y un compartimiento adluminal; lo cual permite el desarrollo posterior a la meiosis de las células germinales, sin tener contacto

con la circulación sistémica.^{110,114,135} Esto es importante para evitar la formación de anticuerpos contra la superficie de los espermatozoides que se comportarían como antígenos de superficie, condicionando una auto intolerancia inmunológica.

Estudios previos han mostrado que la regulación de la espermatogénesis por la FSH y la testosterona se realiza a través de receptores específicos en la célula de Sertoli.^{17,45} El papel que cada una de estas hormonas cumple, en la regulación de la función de células de Sertoli y la espermatogénesis, se ha dilucidado a través de estudios realizados en ratones que carecen de hormonas específicas o de receptores de hormonas. En los animales que carecen de FSH (FSH KO) o del receptor de FSH (FSHRKO) hay una reducción en el número de células de Sertoli y de células germinales. En contraste, en aquellos casos en los que existe una ausencia del receptores de andrógenos (RA), o bien existe un cambio molecular del RA, debido a mutación, delección, etc, -tal como ocurre en la mutación en el receptor (*Tfm*) o específicamente en las células de Sertoli (SCARKO)- existe una detención de espermatogénesis durante la meiosis temprana.^{56,60,150,178,179,192} Por tanto, la FSH parece actuar induciendo la proliferación de las células de Sertoli y de las células germinales y "optimizando" el progreso de espermatogénesis, mientras que la acción de la testosterona sobre las células de Sertoli es crítico para la progresión de la meiosis.

Abel et al., en el año 2008¹ fueron los que pudieron demostrar completamente, sin posibilidad de refutación, que la espermatogénesis depende de la acción de la FSH y de los andrógenos sobre las células de Sertoli, con un efecto directo en la iniciación de la meiosis. Además, ambas hormonas actúan para mantener el número de las células germinales, pero realmente es una necesidad absoluta de los andrógenos completar la meiosis.^{1,176} Los mecanismos por los cuales los andrógenos ejercen este control, siguen siendo mal conocidos: Se sabe que las concentraciones endógenas de testosterona, en los roedores de laboratorio, son superiores en la etapa VIII que en cualquier otra etapa del ciclo espermático, y estudios de inmunohistoquímica también revelan cambios cíclicos en la concentración de los RA en la célula de Sertoli, culminando en la etapa VII.¹⁷¹ Una dependencia entre el estadio madurativo del epitelio germinal y la expresión del RA también se ha observado en el humano.¹⁵⁸ Por otro lado, la mayoría de las proteínas secretadas en el tubo seminífero por la testosterona tienen su principal diana en las etapas VI–VIII del ciclo celular.¹⁵¹

Al menos cuatro pasos del desarrollo de las células germinales son objetivo claro de control por la acción de los andrógenos: 1) la diferenciación de la espermatogonia, 2) la progresión de la meiosis, 3) la adherencia y el desarrollo de la espermátida, y 4) la espermiación.^{171,176}

La secreción y el metabolismo de los andrógenos están regulados por el RA. En el testículo humano, el RA se expresa en el núcleo de las células de Sertoli, de las células de Leydig y de las células mioides peritubulares. El RA pertenece a la superfamilia de receptor hormonal nuclear de factores de transcripción activados en el ligando, y en esta familia también se incluyen receptores para otras hormonas esteroides de los mamíferos, tales como el receptor de los glucocorticoides (GR), el receptor de los mineralocorticoides (MR), el receptor de la progesterona (PR) y los receptores de los estrógenos (ER alfa y ER beta). El gen RA en el ser humano está localizado en el cromosoma X en la posición Xq11-q12, que abarca unas 90 mil pares de bases (kb) que conforman ocho exones, una gran región 5' - (5' -UTR, 1.1-kb de tamaño) y una región muy grande 3' - (3' -UTR, tamaño 6.8-kb).¹³⁰ Todos los exones del RA contribuyen a una transcripción que codifica una proteína modular de 919 aminoácidos con una masa molecular de 110 kDa.⁷⁰

En la presente Tesis, uno de los marcadores funcionales utilizados para medir la capacidad funcional de las células de Sertoli fue el RA. Para ello se usaron métodos inmunohistoquímicos, usando un anticuerpo monoclonal anti-RA, de modo que la intensidad de marcaje se determinó mediante análisis de imagen, con cuantificación microdensitométrica en los núcleos de las células de Sertoli inmunoteñidos.

En el testículo adulto normal y en relación con los estadios madurativos de la espermatogénesis, las células de Sertoli presentan un inmunomarcaje de RA variable, de modo que en los estudios realizados por Suarez-Quian et al.¹⁵⁸ la intensidad de la tinción fue menor en las etapas V y VI del ciclo del epitelio seminífero que en la etapa III y fase III, pero la intensidad de tinción fue mayor que en las etapas I y II.¹⁵⁸ En los testículos humanos, no se ha observado inmunotinción del RA en las células germinales; sin embargo, Zuccarello et al.¹⁹⁴ detectaron una cantidad significativa de ARN mensajero de RA en espermatozoides humanos maduros, equivalente al 30% de lo que se encuentra en los testículos. La proteína del receptor de andrógenos se encontró en espermatozoides con carga genética X y Y. Esto pudiera estar asociado con la acción de los andrógenos en el momento final de la maduración

espermática, proceso que ocurre finalmente a nivel del epidídimo. Nuestras determinaciones microdensitométricas corroboraron un inmunomarcaje de mayor intensidad en el testículo humano normal al compararlo con los otros grupos estudiados. Estos hallazgos los podemos observar claramente en los cortes histológicos, donde hay una correlación importante entre la inmunotinción de los núcleos de las células de Sertoli de tubos seminíferos con espermatogénesis conservada. Pero además nuestros resultados en humanos son congruentes con los resultados obtenidos en una gran variedad de modelos experimentales, en los que también se ha demostrado que una supresión de andrógenos endógenos provoca un bloqueo temprano en la meiosis, y, contrariamente, la administración concomitante de testosterona, o de uno de sus metabolitos activos, permite la finalización de la meiosis y formación de las espermátidas.^{177,194}

Teóricamente, los andrógenos podrían actuar bien directamente sobre las células germinales,¹⁹⁴ o bien afectar al desarrollo de las células germinales indirectamente al actuar sobre las células testiculares somáticas, como las células de Sertoli y las células mioides de la zona peritubular.^{5,6,51,180} Una acción directa en las células germinales a través de la vía clásica por acción sobre el RA parece más bien poco probable, ya que la mayoría de las pruebas sugieren que en los roedores, después del parto, las células germinales no expresan el RA.¹⁷¹ Si los andrógenos actúan indirectamente a través de las células somáticas, las células de Sertoli son las candidatas principales a cumplir esta función, dado a su íntima relación funcional con el desarrollo de las células germinales; las células de Sertoli adulta inequívocamente expresan el RA. Curiosamente, sin embargo, la expresión del RA en las células de Sertoli comienza de forma muy tardía (3-5 días después del parto en ratas y ratones, y después de los 4 años de edad y con un aumento progresivo hasta los 8 años en el hombre).⁴⁶ Esta podría ser la razón de porqué no responden a la alta concentración de andrógenos intratesticular existente en la vida fetal y en los primeros años de vida después del parto.¹⁵¹ Sin embargo, una vez que la espermatogénesis se ha iniciado, se observan cambios cíclicos en la expresión del RA, tanto en roedores como en humanos, lo que sugiere que la maduración de las células germinales y su respuesta a la acción de los andrógenos está regulada por la concentración del RA en las células de Sertoli.^{158,171}

El estudio de inhibina B en los hombres normales y en los pacientes andrológicos ha sido un área de activa investigación durante la última década, tras la descripción por varios

grupos de investigación de una relación inversa entre la FSH y la inhibina B.^{77,166,167} Esta hormona glicoprotéica se sintetiza fundamentalmente en las células de Sertoli testiculares, con una discreta producción en las células de Leydig. La inhibina B está estrechamente ligada a la función reproductiva y la síntesis de espermatozoides. Los niveles séricos de inhibina B se correlacionan con los niveles de espermatogénesis. Hay pruebas sólidas de que la inhibina B puede ser más precisa que la FSH en la predicción de la presencia de espermatozoides en los pacientes con azoospermia no obstructiva,¹¹⁶ y el uso de inhibina B con FSH puede ser el mejor test predictivo para encontrar espermatozoides testiculares, mediante su extracción por aspiración en las pequeñas muestras de tejido testicular obtenido por biopsia, con fines terapéuticos en métodos de reproducción asistida. Los niveles de inhibina B reflejan, pues, la función de las células de Sertoli.^{2,7,11-14,21,77,94,115,116,127,166}

Estudios bioquímicos previos han demostrado que la inhibina es un péptido hormonal que regula, mediante un proceso de retroalimentación positiva, la secreción y producción de FSH desde la hipófisis anterior.⁹¹ Existen dos formas bioactivas principales de la inhibina: el dímero A, que está constituido por una subunidad a y una subunidad Ab, y el dímero B, que está formado por una subunidad a y una subunidad Bb.⁵⁸ La inhibina B es la forma de inhibina bioactiva principal circulante en el hombre.⁹¹ La inhibina está principalmente producida en la célula de Sertoli del testículo,^{55,105,111,146,154,156,170,191} aunque también se inmunolocaliza en el citoplasma de las células de Leydig humanas, tal como se ha demostrado en el presente estudio. Además, los hombres con espermatogénesis alterada tienen niveles bajos o indetectables de inhibina B.¹⁰

En el presente estudio, y en relación con los estadios madurativos de la espermatogénesis del varón normal, se ha visto una evidente expresión de inhibina B en el interior del citoplasma de las células de Sertoli en todos los estadios madurativos, si bien existe una ligera variabilidad de intensidad de inmunotinción cuando hemos realizado la cuantificación de la intensidad del marcaje. Ello no debe sorprendernos, ya que existe una íntima regulación paracrina entre los estadios madurativos y funcionales de las células de Sertoli y cada uno de los estadios madurativos de la espermatogénesis de las áreas adyacentes.

El inmunomarcaje con el anticuerpo anti-inhibina B permite visualizar muy bien los perfiles del citoplasma de las células de Sertoli con una intensa coloración marrón, propia del revelado con diaminobencidina del sustrato de la reacción inmunoenzimática de la

peroxidasa; de este modo, se aprecia que la superficie de las carillas laterales de las células de Sertoli se adaptan íntimamente a las células espermatogénicas. En los estadios en los que se alcanza una diferenciación de espermátidas elongadas maduras, la inmunoexpresión de inhibina B es mayor que en aquellas asociaciones en las que sólo se ve diferenciación hasta el estadio de espermátida redonda inmadura. Estos datos sugieren que la maduración completa de la espermatogénesis, incluida la espermiogénesis, viene determinada por una robusta expresión de inhibina B. Y contrariamente, las áreas de los tubos seminíferos sin completar la meiosis se asocian a células de Sertoli con menor inmunomarcaje de inhibina B. Estos datos morfológicos, en parte, se relaciona con los datos bioquímicos de detección de inhibina B en suero, puesto que se ha descrito una relación directa entre las concentraciones de inhibina B en suero y la concentración espermática,¹⁶⁶ concluyendo que la inhibina B es un marcador de la función testicular y específicamente de la función de las células de Sertoli; también la determinación de los niveles séricos de inhibina B tiene valor cuando se correlaciona con el grado de espermatogénesis en hombres con azoospermia.^{77,167}

En definitiva, está completamente establecido que el número de células germinales en el adulto normal está relacionado directamente con el número de células de Sertoli funcionales.¹⁵¹ Además, en la presente Tesis se demuestra que es necesaria una íntima integración morfológica y funcional de las células de Sertoli que exige una adecuada expresión de inhibina B, la cual se altera significativamente en las lesiones primarias y secundarias de los tubos seminíferos. Estos datos se pueden relacionar con datos bioquímicos de determinación sérica de inhibina B, la cual en hombres con azoospermia no obstructiva no siempre se correlaciona con el grado de la alteración de la espermatogénesis.^{85,112}

Se sabe que la inhibina B es la forma circulante producida en el hombre durante la vida adulta y también durante el desarrollo fetal e infantil.^{10,91,98,175} En la pubertad, las células de Sertoli parecen ser la fuente celular más importante de la producción de inhibina B, la cual completa la maduración puberal de la espermatogénesis.¹³⁹ Mientras que, después de la pubertad, los niveles séricos de inhibina B están estrechamente relacionados con el estado de la espermatogénesis, como se muestra por la correlación entre los niveles séricos de inhibina B y el recuento espermático.¹³³ Los niveles séricos de inhibina B en hombres hipogonadotrópicos están en el rango más bajo de los hombres normales,¹⁴⁰ aunque esto

puede ser debido a un número reducido de células de Sertoli más que a una disminución de la producción de inhibina B causada por niveles bajos de FSH.

En los testículos obtenidos en pacientes de edad avanzada hemos observado cambios en la intensidad de inmunomarcaje de inhibina B en tubos seminíferos de lobulillos testiculares próximos e, incluso, a lo largo del mismo tubo seminífero, con áreas fuertemente teñidas, y otras con rarefacción de la inmunotinción. Estos cambios de la expresión de inhibina B de las células de Sertoli en los tubos seminíferos adyacentes no nos deben sorprender, ya que no constituyen hallazgos aislados y puntales de una determinada molécula -en este caso inhibina B- muy importante en la regulación de las células de Sertoli; todo lo contrario, ocurre también cuando se exploran otras moléculas reguladoras de las células de Sertoli. En concreto, en nuestro laboratorio hemos visto también variaciones importantes de la expresión del RA en el núcleo de las células de Sertoli;^{84,142} es más, recientemente se ha evaluado la inmunolocalización del RA en una serie de testículos de hombres azoospermicos, observándose un mayor número e intensidad de inmunomarcaje de receptor de andrógenos en las células de Sertoli de los casos que presentaban un patrón de solo Sertoli, con respecto a aquellos casos diagnosticados de parada de la espermatogénesis, y también con respecto al encontrado en el testículo de hombres normales (grupo control).¹⁰⁴

En relación con las células de Leydig, tanto el RA como la inhibina B, tal como se ha demostrado en la presente Tesis, se expresan, respectivamente, en el núcleo y en el citoplasma de estas células secretoras de testosterona, aunque en número e intensidad variable, y esta expresión ocurre en aquellas células de Leydig que se localizan en el intersticio testicular o en las que están adosadas a la pared e los tubos seminíferos -las denominadas células de Leydig peritubulares-. En nuestros resultados se ha enfatizado la posible correlación paracrina de la immunoexpresión de inhibina B y del RA en las células de Sertoli, de modo que hemos valorado -por primera vez en nuestro conocimiento mediante métodos inmunohistoquímicos en el testículo humano- una relación entre la espermatogénesis y la función paracrina de las células de Sertoli y de las células intersticiales de Leydig. Por último, las células mioides presentes en la pared que rodea a los tubos seminíferos presentan siempre, tal como hemos corroborado en la presente Tesis, un inmunomarcaje positivo para el RA y nunca expresan inmunohistoquímicamente inhibina B. En el hombre, las células mioides peritubulares podrían cumplir no solo un efecto de sostén para los tubos, sino, además, permitir su

contracción y cumplir una acción paracrina importante en la maduración espermática. Esto parece ser específico para cada especie, ya que en roedores la distribución de estas células es diferentes que en humanos;^{158,180} de hecho, Zhang et al.¹⁹⁰ observaron en roedores una disminución de la cantidad de espermatozoides eyaculados, aunque con fertilidad conservada, y el estudio del tejido testicular demostró una carencia del RA en células mioideas peritubulares.¹⁹⁰

En la infertilidad o la subfertilidad del varón se han encontrado alteraciones funcionales de la regulación paracrina entre las células de Sertoli y las de Leydig que determinan importantes alteraciones en la espermatogénesis. En estos casos, la oligozoospermia (o la azoospermia absoluta) puede ser de etiología obstructiva o secretora debido a un fallo de los testículos para iniciar o mantener la espermatogénesis. En pacientes jóvenes que consultan por azoospermia u oligozoospermia grave pueden observarse signos obstructivos en la biopsia testicular, caracterizados por un incremento significativo del número de espermátidas de tipo adulto, con respecto al número de espermátidas inmaduras (espermátidas redondas), patrón completamente opuesto al característico del hombre adulto normal, en que la biopsia testicular demuestra un menor número de espermátidas maduras que de espermátidas redondas. Otros hallazgos histológicos que sugieren una causa obstructiva de la infertilidad son el aumento del diámetro tubular, el contorno aserrado de los tubos seminíferos y una intensa vacuolización del citoplasma de las células de Sertoli. Estas lesiones obstructivas en el hombre joven no sólo se ven en las azoospermias idiopáticas, sino que suelen ser un dato de frecuente observación en aquellos pacientes vasectomizados que evolucionan con granulomas espermáticos en el extremo proximal de la sección del conducto deferente ipsilateral. Estos granulomas pueden producir un exceso de reabsorción del fluido testicular y epididimario, además de incremento notorio de la reabsorción de lípidos provenientes de la destrucción de espermatozoides, lo que origina una microvacuolización del citoplasma de las células del epidídimo.¹¹⁹ Sin embargo, en la actualidad aproximadamente en el 35 al 40% de los casos de infertilidad en el varón no se detecta un factor etiológico específico.⁵⁷

En el presente estudio hemos encontrado una correlación entre la disminución de la expresión de la inhibina B en las células de Sertoli, situadas adyacentemente a las áreas de los tubos seminíferos que tenían una hipoespermatogénesis severa, con el grado de atrofia del epitelio germinal. Además, estas células de Sertoli, si bien se inmunomarcaban con al

anticuerpo anti-RA, la intensidad de la tinción era muy débil; incluso en las áreas de ausencia competa de línea germinal, las células de Sertoli tenían mínima expresión (solo trazas de marcaje) del RA y de inhibina B. Todos estos datos nos permiten sugerir que en los pacientes jóvenes con oligozoospermia e hipoespermtogénesis severa existe una alteración profunda de la regulación paracrina de las células de Sertoli. Una frecuente causa de azoospermia obstructiva es el varicocele, ya que la masa de sangre acumulada en las venas del plexo pampiniforme del cordón espermático determina una compresión de los conductos eferentes en la cabeza del epidídimo, produciéndose, pues, una obstrucción de la vía espermática, lo que determina alternaciones en el seminograma que agravan los cambios del seminograma propios del varicocele (oligozoospermia, asociada muchas veces a asteno-teratozoospermia), tanto por la acción del incremento de la temperatura y la metabólica que las venas varicosas ejercen directamente sobre los tubos seminíferos. De hecho, el varicocele es el segundo hallazgo más frecuente en infertilidad idiopática en pacientes jóvenes.¹²¹ En estos pacientes con varicocele, se pueden encontrar niveles elevados de FSH, o una hiperrespuesta de FSH y LH a la estimulación con GnRh, y niveles alterados de inhibina B,^{25,53} lo que corrobora nuestros resultados histopatológicos de disminución microdensitométrica de la expresión de inhibina B en los tubos con hipoespermatogénesis asociados a presencia de dilataciones varicosas de las venas intratesticulares.

Estos hallazgos también están en consonancia con la fisiología testicular, puesto que se sabe que la FSH actúa a través de su receptor a nivel de células de Sertoli y modula la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis. La inhibina B expresa la capacidad funcional de la célula de Sertoli y de forma indirecta el estado de la actividad de los tubos seminíferos. Así, la FSH y la inhibina B diferencian entre la patología testicular y la extra-testicular en pacientes con azoospermia; sin embargo, ninguna de estas hormonas se ha establecido convincentemente como índice predictor para el hallazgo de espermatozoides en TESE.^{2,167}

Sin duda alguna, la determinación sérica de inhibina B y la identificación inmunohistoquímica de la expresión de esta molécula son de gran utilidad en la valoración endocrinológica del estado funcional de las células de Sertoli, y por ello son pruebas que frecuentemente se realizan en los estudios endocrinológicos de los pacientes andrológicos. Sin embargo, se ha estimado que las alteraciones hormonales son responsables solamente del 3%

de los casos de infertilidad en el varón.^{57,66} La evaluación endocrina está indicada en pacientes con oligozoospermia ($<10^6/\text{ml}$) o en azoospermicos, más aún si éstos presentan disfunción sexual. Niveles anormalmente bajos de testosterona obligan a repetirla y medir testosterona libre junto con hormona luteinizante (LH) y prolactina (Prl).⁴⁴ En un hombre infértil, una disminución del volumen testicular ($<12 \text{ ml}$) y niveles anormalmente elevados de FSH indican una alteración de la espermatogénesis. Mientras que niveles plasmáticos anormalmente bajos de gonadotropinas sugieren la existencia de una lesión a nivel central (hipotálamo-hipofisaria); en este caso, se debe medir la prolactina plasmática para descartar estados hiperprolactinémicos y la existencia de un tumor hipofisario (prolactinoma). En hombres infértiles obesos, se debe realizar un estudio endocrino- metabólico: prueba de tolerancia a la glucosa con respuesta de insulina, leptina y lipidograma, midiendo además los niveles plasmáticos de testosterona total y estradiol.^{86,129}

De otra parte, cuando comparamos los diferentes grupos de estudio, vemos como en hombres normales existe un mayor marcaje de inhibina B que en individuos ancianos y en los grupos de pacientes con criptorquidia, tanto los prepuberales como los postpuberales. En los pacientes ancianos, es frecuente observar patología obstructiva en la biopsia testicular como consecuencia de obstrucciones de la vía espermática, la cual muy frecuentemente es secundaria a la patología hiperplásica o neoplásica prostática (para revisión ver Nistal y Paniagua, 2008).¹²² En nuestro estudio, en los pacientes ancianos vemos cambios importantes en los cortes histológicos donde se aprecian tubos seminíferos atróficos con células de Sertoli muy degeneradas o regresivas que muestran poca inmunotinción o poca expresión de inhibina B, rodeados de vacuolas intraepiteliales. Estos cambios están asociados a un estado de hipoespermatogénesis intensa con afectación de maduración de las células germinales. Si bien es cierto que la función espermática se mantiene a lo largo de la vida del hombre, existen cambios degenerativos por la edad y las enfermedades crónicas propias de la vejez que modifican de cierta manera la función de las células testiculares, condicionando una disminución de la efectividad de la espermatogénesis. En este sentido, Sampson et al.¹⁴⁹ describe que el envejecimiento está asociado con cambios testiculares histomorfológicos que se desarrollan gradualmente. Una reducción en el número de espermatogonias tipo A, un número cada vez mayor de espermatogonias multinucleadas y desarrollo de megaespermátocitos, espermátidas gigantes y espermatogonias multicapas. Una disminución en el número y la función de las células de Sertoli con el envejecimiento puede

correlacionarse con una disminución del recuento de espermatozoides. Además, en el hombre anciano se suele encontrar una disminución en el número de células de Leydig, asociándose alteraciones patológicas de la vascularización arterial testicular –fundamentalmente aterosclerosis-. Así mismo, la pared peritubular está engrosada y fibrosada (hialinizada); por último, no es infrecuente observar ampliación y herniaciones de la pared peritubular -consistentes en protuberancias de la basal membrana de los tubos seminíferos-. Además en los testículos de hombre ancianos, se observa un aumento de depósito de lipofucsina en las células de Leydig y un declive funcional en cortisol mitocondrial de células de Leydig, debido a suministro reducido de los precursores de la hormona esteroide mitocondrial.¹⁴⁹ Todos estos cambios favorecen a una alteración de la función de las células de sostén testicular, lo cual queda demostrado claramente por un menor marcaje de inhibina B en el citoplasma de las células de Sertoli y de las células de Leydig.

En hombres de edad intermedia y avanzada, recientemente se ha relacionado la obesidad con una disfunción de la función testicular. Es más, la obesidad, y la diabetes forman parte del síndrome metabólico, en el cual también muy frecuentemente se produce un hipogonadismo y disminución de la fertilidad del varón. Con todo, aunque se conoce el efecto de la obesidad en algunas funciones gonadales en los hombres, no se ha investigado profundamente su efecto sobre la morfología y función de las células de Sertoli. Globerman et al.⁷³ sugirieron la hipótesis de que el nivel de Inhibina B en suero está disminuido en hombres con obesidad severa, y que este cambio persiste después de la pérdida de peso significativa. La FSH permaneció indebidamente disminuida en 2 de los 4 pacientes cuya inhibina B seguía siendo baja. Este estudio también confirma que los hombres obesos tienen testosterona total y libre baja, lo que marca un hipogonadismo hipogonadotrópico. También Winters et al.¹⁸⁶ observaron que los niveles de inhibina B disminuyeron cuando la obesidad se incrementaba en los hombres adultos jóvenes. Debido a que cada célula de Sertoli se piensa sirve de apoyo a un número finito de células germinales, una disminución del número de las células de Sertoli en la obesidad pueden predisponer a un menor recuento de espermatozoides en la edad adulta.¹⁸⁶

La criptorquidia es la causa congénita más frecuente de alteración primaria del testículo infantil.¹²² Ya en la vida adulta, estos hombres con historia de maldescenso testicular uni o bilateral tienen pobre calidad del semen con un recuento bajo de espermatozoides y fertilidad

alterada,⁷⁸ asociada en ocasiones a otras alteraciones morfológicas del aparato genital masculino.^{57,83,84,93,118,122,143} En estos casos con criptorquidia o, con una creciente prevalencia, criptorquidia e hipospadias asociadas se ha visto una disminución significativa de la calidad del semen, y un aumento de la incidencia del cáncer de testículo. Con el fin de definir y unificar estos procesos clínicos y patológicos testiculares, desde hace dos décadas se ha propuesto la definición de un completo cuadro denominado disgenesia testicular. Esta disgenesia testicular no tiene una causa única y conocida, antes bien, se ha especulado que puede ser debida, entre otras, a factores ambientales y hormonales que actuarían en la vida fetal.^{42,63,65,87,89,147} Los pacientes con disgenesia testicular cada vez son más susceptibles de entrar en programas de reproducción asistida, aunque los resultados obtenidos dependen muy directamente del grado de lesión testicular.^{19,101} Con todo, está completamente establecido que el tratamiento del testículo anormalmente descendido –presentado como malformación única o bien asociado y formando parte del síndrome de disgenesia testicular- debe ser, en primer lugar, una orquidopexia quirúrgica y en segundo lugar la aplicación de tratamientos hormonales adecuados. La corrección de la criptorquidia no garantiza la recuperación total de la fertilidad, ya que existen daños celulares importantes que no siempre dependen del tiempo de evolución de la criptorquidia.

En el presente estudio histopatológico se confirma que los testículos criptorquídicos extirpados después de la pubertad presentan tres patrones específicos de tubos seminíferos: 1) tubos seminíferos con diferenciación focal de células germinales, pero sin alcanzar una espermatogénesis completa; 2) tubos compuestos exclusivamente por un patrón de solo Sertoli, en los que predominan las células de Sertoli maduras, aunque presentan algunas células de apariencia inmadura (células de Sertoli de tipo infantil) y otras con cambios disgenéticos; y 3) tubos seminíferos de muy pequeñas dimensiones, de contornos irregulares y compuestos exclusivamente de células de Sertoli disgenéticas.¹⁴²

En la presente Tesis hemos encontrado cambios de inmunomarcaje que experimenta la inhibina B en los testículos criptorquídicos extirpados en adolescentes, los cuales presumiblemente están en consonancia con las lesiones tubulares ya descritas en estudios previos de testículos criptorquídicos. En efecto, en el hombre, el estudio de los testículos maldescendidos muestra que la mayoría de tubos seminíferos que han experimentado crecimiento postpuberal presentan una variable expresión de inhibina B, pero además

presentan un moderado y a veces intenso marcaje del RA.¹⁴² Contrariamente, los tubos con células de Sertoli inmaduras o disgenéticas solo se marcaban tenuemente con el anticuerpo anti-inhibina B y además, en estos casos la expresión del RA estaba significativamente disminuida. Todos estos datos obtenidos en el presente estudio permiten sugerir que existe una correlación directa entre la disminución de la expresión de RA y de la inhibina B en las células de Sertoli, lo cual se relaciona con la gravedad de las lesiones disgenéticas del testículo criptorquídico.¹⁴²

Pero además, estos cambios inmunohistoquímicos del RA y de la inhibina Be en las células de Sertoli disgenéticas no son hallazgos aislados; antes bien, está demostrado que en la patología congénita testicular, incluida la criptorquidia, las células de Sertoli también cambian el perfil inmunohistoquímico normal, incrementando los filamentos de vimentina y sobretodo de queratinas de bajo peso molecular y aumentando el número de lisosomas secundarios y de cuerpos residuales, positivos inmunohistoquímicamente para la alfa-1 antitripsina y el CD 68. Estos cambios cuando son muy manifiestos, provocan un aspecto histológico granular del citoplasma granulares de las células de Sertoli- denominado células de Sertoli granulares-. Los cambios granulares se producen por una acumulación anormal de gran cantidad de lisosomas secundarios; además, estas células presentan alteraciones del citoesqueleto con disminución de filamentos de vimentina y no muestran inmuno-reactividad con anticuerpos anti-inhibina B, lo que sugiere que estas células de Sertoli granulares presentan importantes alteraciones funcionales. Por ello, es asimismo verosímil especular que estas lesiones presentes en algunos testículos criptorquídicos constituyen una anomalía primaria e irreversible de la célula de Sertoli que puede contribuir, entre otros varios factores, al desarrollo de infertilidad en los pacientes criptorquídicos.¹²⁵

Además, la criptorquidia, cuando se asocia a otras malformaciones genitourinarias y sobre todo cuando se desarrolla un carcinoma in situ testicular (CIS), forma parte, tal como lo hemos referido anteriormente, del síndrome de disgenesia testicular.¹³ Desde el punto de vista de la histopatología testicular, este síndrome se caracteriza por varias lesiones que están íntimamente asociadas a alteraciones morfológicas y funcionales de las células de Sertoli. En efecto, en estos pacientes es muy habitual encontrar en el testículo la presencia de microlitos – diagnosticándose entonces la denominada microlitiasis testicular-; pero además, en los testículos disgenéticos, son criterios que facilitan el diagnóstico la visualización de tubos

seminíferos con un patrón de solo Sertoli, la presencia del CIS y, por último, la formación de tubos seminíferos muy inmaduros que contienen células de Sertoli disgenéticas y que constituyen los denominados nódulos de células de Sertoli. Estos nódulos de células de Sertoli presentan cambios significativos de la expresión de marcadores característicos de las células de Sertoli como son la vimentina, la inhibina B, el RA, la AMH, la citoqueratina 18, y la conexina 43.⁷¹

Es posible que estas alteraciones funcionales de las células de Sertoli en la criptorquidia, con disminución o ausencia de expresión del RA y de la inhibina B, se produzcan durante el desarrollo fetal o infantil del testículo. En efecto, se ha demostrado que en la infancia, los niveles de gonadotropinas son bajos, pero quizás suficientes para sostener los niveles séricos de inhibina B encontrados en niños pequeños.^{12,30} Además, estudios experimentales en primates no humanos revelan que el número de células de Sertoli se incrementa entre el período neonatal y la juventud, siendo muy significativo el aumento en la pubertad.¹⁵³ Ambos incrementos en el número de células de Sertoli en la vida neonatal y en la pubertad son paralelos a una elevación de los niveles circulantes de inhibina B,^{13,185} demostrándose asimismo que la inhibina B se correlaciona positivamente con el número de células de Sertoli.¹⁴¹

En efecto, durante el desarrollo fetal y de modo más preeminente durante el desarrollo del testículo infantil se ha propuesto que la inhibina B, y también la hormona anti-Mülleriana (AMH), son los dos marcadores directos de la función de células de Sertoli y, así mismo, ambas moléculas se consideran marcadores indirectos del inicio de la diferenciación de la espermatogénesis en el testículo infantil y prepuberal.^{102,164,168} En la vida después del parto, la producción testicular de la AMH es estimulada por la FSH y poderosamente inhibida por los andrógenos. En los hombres con hipogonadismo prepuberal primario o central de aparición fetal o en la infancia con afectación de la gónada, los niveles séricos de AMH están bajos. Por el contrario, cuando hipogonadismo sólo afecta a las células de Leydig (es decir, receptor de gonadotropina coriónica humana LH o defectos de las enzimas esteroideogénicas), el suero AMH es normal/alta. La AMH también es normal/alta en pacientes con insensibilidad androgénica. En los pacientes puberales con hipogonadismo central, la AMH es baja en el estadio de Tanner I, lo que refleja la falta de estímulo de FSH. La determinación de la AMH es útil en la evaluación de la función gonadal, sin necesidad de pruebas de estimulación y

orienta el diagnóstico etiológico de hipogonadismo masculino en Pediatría. Por otra parte, la AMH sérica es un excelente marcador de acción de la FSH y de los andrógenos a nivel de los testículos.⁸⁰ Por otro lado, los niveles de suero de la AMH se correlacionan directamente con los parámetros espermáticos de los hombres con antecedentes de testículos mal descendidos; por lo que, la medición de la AMH no mejora el diagnóstico clínico de rutina, pero debe ser evaluado aún más en los pacientes con los testículos mal descendidos. La AMH podría servir como un marcador indirecto del número y función de células de Sertoli, y del proceso de maduración de los espermatozoides en estos hombres.^{36,168}

El estudio de cortes testiculares de niños prepuberales permite corroborar la asociación de un progresivo incremento de la expresión del RA con una asimismo progresiva disminución en el contenido de la AMH en las células de Sertoli.¹⁴⁴ En consecuencia, la expresión de ARN mensajero para el RA es inferior y la expresión de ARN mensajero de la AMH es más alto en los testículos fetales que en los testículos adultos. El RA funcional es, es pues, esencial para la represión de la AMH mediada por la testosterona en las células de Sertoli.³⁸

En los casos con criptorquidia, y en relación con la expresión de inhibina B durante el desarrollo prepupal, hemos relacionado los cambios de inhibina B en el grupo de pacientes infantiles y prepuberales, con aquellos en los que el testículo se extirpó en adolescentes que habían experimentado la pubertad y en pacientes adultos. En todos los casos con testículo mal descendido hemos encontrado niveles de inmunomarcaje más bajos comparados con individuos normales, siendo menor el marcaje en los pacientes postpuberales que en los prepuberales. En cortes histológicos de testículos con criptorquidia infantil o prepupal observamos un intersticio amplio y tubos seminíferos de reducido tamaño, con células de Sertoli disgenéticas y muy baja tinción de inhibina B; en algunos cortes, se observan células germinales rodeadas de células de Sertoli con moderada expresión de inhibina B. Además, en la mayoría de los casos las células de Sertoli son disgenéticas. Estos cambios patológicos de la expresión de inhibina B en la criptorquidia infantil nos permiten una explicación apoyada en los trabajos de publicaciones previas, ya que, en nuestro conocimiento, solo una publicación -con resultados muy parciales- comenta que la coloración de inhibina B del testículo prepupal, cuando se compara con la del testículo adulto normal, es relativamente

débil, lo cual se puede observar también en el testículo de un niño de tan solo 4,5 meses de edad.¹²

Estas alteraciones de la expresión del RA y de la inhibina B en las células de Sertoli de los testículo criptorquídicos infantiles prepuberales no es un hecho aislado que indica la disfunción esta células de Sertoli, antes bien, en estos casos de criptorquidia estudiados durante la infancia y como dato que corrobora las profundas alteraciones de las células de Sertoli, hemos encontrado una ausencia o solo vestigios del RA en los núcleos de las células de Sertoli, lo que contrasta manifiestamente con el inmunomarcaje positivo en las células intersticiales. Estos datos están en consonancia con la baja activada androgénica observada en niños prepuberales si se comparan con los postpuberales, aunque es evidente que en los testículos fetales y temprano postnatal, sus células de Leydig, a medida que van madurando, secretan activamente andrógenos.^{23,37,160} Estos datos funcionales de la secreción de andrógenos en niños se pueden, a su vez, relacionarse con datos morfológicos observados en testículos fetales e infantiles humanos normales, en los que el RA se expresa en las células de Leydig y peritubulares pero no en las células de Sertoli. Esto coincide con la alta expresión de la AMH en las células de Sertoli infantiles cuando aún no se ha iniciado la espermatogénesis.

Es más, una característica interesante de desarrollo testicular es que, aunque la producción de testosterona es tan activa en los períodos postnatales y al inicio de la pubertad, las células de Sertoli permanecen inmaduras y la espermatogénesis no se activa hasta entrada la pubertad. Lo que sugiere pensar, que existe una ausencia de expresión del RA en las células de Sertoli, equivalente a una etapa fisiológica de insensibilidad androgénica dentro de las gónadas masculinas en los períodos de la vida fetal postnatal y al principio de la pubertad.^{46,144,188} Estos datos de ausencia de expresión inmunohistoquímica del RA que hemos corroborado en el testículo infantil se relacionan íntimamente con la disminución dramática de la secreción de testosterona de las células de Leydig y con la disminución del número de células de Leydig infantiles inmunomarcadas con anticuerpos anti-testosterona.¹²⁶ Las células de Sertoli siguen siendo inmaduras y la espermatogénesis está frenada en la etapa premeiótica. En la pubertad, las células de Leydig se diferencian una vez más y la concentración de testosterona aumenta y provoca la maduración de células de Sertoli, disminuyendo la síntesis y secreción de la AMH y las células germinales entran a la meiosis, iniciándose la espermatogénesis como dato evidente del desarrollo puberal del varón.

Recordemos que los testículos criptorquídicos, si bien muy probablemente tienen malformaciones disgenéticas, se considera muy importante en la evolución de estas lesiones el tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la corrección del mal descenso testicular, lo que determina que el microambiente testicular sea hostil para las células y condicione una afectación frecuentemente irreversible de su función.^{75,122,123,142} En relación con la criptorquidia postpuberal, en los cortes histológicos vemos tubos seminíferos que han experimentado cambios puberales de crecimiento; sin embargo, muestran atrofia, se observa un intersticio amplio y con signos histológicos de fibrosis, con células de Leydig escasas. La valoración de inmunomarcaje de inhibina B demuestra una amplia variabilidad en las células de Sertoli disgenéticas. En estas células se detecta un marcaje bajo de inhibina B. Además, observamos tubos con solo células de Sertoli o células de Sertoli inmaduras con escasa inhibina B. Estos hallazgos histológicos están acordes a los presentados en la clasificación de Nistal et al.,¹²³ donde existe un predominio en los estadios II y III de células de Sertoli disgenéticas e inmaduras, con una disminución importante en el número de las células germinales. Estos profundos cambios celulares conllevan una alteración funcional, lo que se traduce en un inmunomarcaje menor de inhibina B. En definitiva, cuando analizamos los cuatro grupos estudiados, observamos cómo los adultos con criptorquidia presentan un menor marcaje de inhibina B. Esto puede estar relacionado con un mayor daño celular, debido al tiempo que ha estado sometido esta gónada a un ambiente hostil, la temperatura, la ubicación, y la probable afectación de la circulación sanguínea, entre otros elementos del microambiente testicular, que condicionan un estado poco adecuado para el desarrollo normal de las células.¹²³

Todos estos datos nos permiten sugerir que, el estudio pormenorizado de estos testículos criptorquídicos postpuberales constituye un excelente modelo natural para explorar las regulaciones paracrinas de las células de Sertoli, ya que en un mismo testículo se puede observar todo un espectro de distintas lesiones en lobulillos testiculares muy próximos entre sí, incluidos varios tipos morfológicos de patrones de “solo Sertoli”, con presencia de células de Sertoli que han experimentado la transformación puberal hasta otras células de Sertoli extraordinariamente inmaduras y disgenéticas.¹⁴² En estos casos existen cambios evidentes en la inmunoexpresión de inhibina B en el citoplasma de las células de Sertoli, de modo que las más inmaduras y disgenéticas carecen o sólo muestran trazas de inmunomarcaje, mientras que otras células con esbozo de maduración presentan marcaje de inhibina B de disposición

perinuclear, e incluso intensificándose a la altura de donde deberían encontrarse las uniones Sertoli-Sertoli, las cuales también son anómalas en los testículos disgenéticos.^{122-124,142,143} Los hallazgos anteriormente descritos sugieren que, si bien los niveles de inhibina B sérica en niños prepuberales fueron independientes de la presencia de células germinales, los niveles de inhibina B sérica en hombres postpuberales, o mejor aún en los tubos seminíferos que han sufrido una transformación y crecimiento puberal, están estrechamente relacionados con la presencia de células germinales que ya han experimentado la división meiótica.

En relación con las células de Leydig observamos que existe un comportamiento relativamente similar al observado en las células de Sertoli, donde hay un inmunomarcaje adecuado en los cortes de sujetos adultos normales, con un menor marcaje en el grupo de ancianos y en los pacientes con criptorquidia, observándose un menor marcaje en la criptorquidia postpuberal. Si bien es cierto que observamos una afectación importante en el espacio intersticial en los cortes histológicos de testículos criptorquídicos, lo que nos hace pensar en una afectación a nivel de la función celular, hay que tener en consideración que la inhibina B se sintetiza en las células de Sertoli y, al haber un daño en estas células, conlleva una afectación de la acción de los mediadores paracrinós y autocrinós de las mismas; de tal manera que pudiéramos considerarlo como un efecto en cadena a nivel del microambiente testicular. Así vemos como, al comparar los diferentes compartimientos celulares, existe una mayor tinción de inhibina B en las células de Sertoli, con respecto a las células de Leydig y las vías espermáticas, patrón que se mantiene en los grupos normales y en niños con criptorquidia. No obstante, en el grupo de criptorquidia postpuberal existe una similitud de tinción entre las células de Sertoli y de Leydig, lo cual marca una mayor afectación de la función de las células de Sertoli.

En definitiva, en la presente Tesis Doctoral, se ha encontrado una correlación entre el inmunomarcaje de inhibina B y el RA en de las células de Sertoli en todos los grupos estudiados, lo cual permite distinguir histofisiológicamente el grado de maduración y la funcionalidad de las células de Sertoli humanas en el testículo normal y en la disgenesia testicular presente en los testículos criptorquídicos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA. La expresión inmunohistoquímica de Inhibina B y del Receptor de Andrógenos (RA) en las células de Sertoli experimenta pequeños cambios con respecto a los distintos estadios madurativos del epitelio seminífero. Sin embargo, se encuentra una menor intensidad de inmunoexpresión de Inhibina B en las células de Sertoli presentes en aquellos estadios madurativos en los que aún no se ha terminado la diferenciación de la espermatogénesis.

SEGUNDA. En la senectud, las células de Sertoli que se disponen en la vecindad de las áreas del tubo seminífero con hipoespermatogénesis intensa y atrofia tubular tienen una significativa menor expresión de Inhibina B y de RA, si se compara con aquellas áreas del epitelio seminífero que presentan hipoespermatogénesis moderada, con parcial diferenciación de espermatoцитos de primer orden en fase de meiosis.

TERCERA. En los testículos criptorquídicos extirpados después de la pubertad, los tubos seminíferos que han experimentado el crecimiento puberal contienen células de Sertoli de tipo adulto, aunque con disminución significativa de la expresión de Inhibina B y de RA, cuando se compara con los valores microdensitométricos de la inmunoexpresión de ambas moléculas en las células de Sertoli de hombres adultos normales. Contrariamente, los tubos pequeños y malformados están constituidos exclusivamente por unas células de Sertoli de tipo infantil y otras de tipo disgenético, siendo mínima la expresión tanto de Inhibina B como del RA.

CUARTA. La disminución o ausencia de inmunotinción de Inhibina B y del RA en las células de Sertoli comienzan a observarse ya en los testículos criptorquídicos extirpados en niños prepuberales, lo que permite sugerir que las alteraciones morfológicas y funcionales de las células de Sertoli en los tubos disgenéticos son profundas, irreversibles y muy probablemente de origen congénito.

QUINTA. Se ha encontrado una correlación directa y significativa cuando se comparan las cuantificaciones microdensitométricas de Inhibina B con las del RA de las células de Sertoli, tanto en los testículos adultos e infantiles normales, como en los casos de criptorquidia infantil y postpuberal.

SEXTA. Las cuantificaciones microdensitométricas de Inhibina B y de RA en las células de Leydig han demostrado una significativa menor intensidad de inmunomarcaje en los testículos criptorquídicos que las obtenidas en los testículos normales.

SÉPTIMA. La correlación de los datos histológicos, inmunohistoquímicos y cuantitativos de la expresión de Inhibina B y del RA en los testículos humanos normales confirman la existencia de una correlación paracrina entre las células de Sertoli, las células de Leydig y las células germinales. Esta regulación paracrina se pierde en los testículos disgenéticos de los pacientes criptorquídicos.

RESUMEN

RESUMEN

Introducción. La determinación sérica de Inhibina B y del Receptor de Andrógenos (RA) se ha correlacionado con la función de las células de Sertoli en hombres normales; sin embargo, se han publicado datos discrepantes en la determinación sérica de Inhibina B en diferentes patologías que cursan con subfertilidad.

La detección inmunohistoquímica (IH) de Inhibina B y de RA ha sido demostrada en las células de Sertoli de hombres adultos normales y en casos con tumores de células de Sertoli. En la presente Tesis se pretende estudiar: 1) la correlación inmunohistoquímica entre la expresión de Inhibina B y del RA en los diferentes estadios madurativos del epitelio seminífero, 2) evaluar los cambios de la expresión de Inhibina B y de RA en relación con el desarrollo de hipoespermatogénesis focal, de hipoespermatogénesis intensa y, por último, en las áreas de atrofia de los tubos seminíferos en pacientes ancianos o en pacientes con subfertilidad, y 3) las comparaciones cuantitativas de la expresión de Inhibina B y del RA en las células de Sertoli y en las células de Leydig del testículo criptorquídico, en relación con la presencia de tubos disgenéticos y con tubos que han experimentado el crecimiento puberal.

Métodos. La expresión IH de Inhibina B y de RA se ha evaluado mediante el método de estreptavidina-biotina-peroxida, revelado con diaminobencidina y usando un anticuerpo anti-Inhibina B (Dako) y anti-RA (Dako) ambos a una dilución 1:500. La cuantificación de estas moléculas se realiza mediante la digitalización de las imágenes microscópicas y su valoración microdensitométrica con un programa Leica, cuantificándose en cada caso al menos una superficie testicular de 3.000 micras cuadradas.

Resultados. En relación con los estadios de la espermatogénesis, se ha encontrado una baja inmunotinción de Inhibina B en el compartimento adluminal de las células de Sertoli que se dispone en íntima vecindad de asociaciones del epitelio seminífero en las que están presentes espermátidas inmaduras ($p < 0.001$), con respecto a las asociaciones con espermátidas maduras ($p < 0.001$). Sin embargo, la significación fue menor ($p < 0.05$) cuando se considera el estadio madurativo que contiene sólo diferenciación de espermatoцитos. La expresión del RA en los núcleos de las células de Sertoli es variable.

En las áreas de tubos con hipoespermatogénesis focal, se ha observado una disminución significativa de la expresión de Inhibina B y del RA de las células de Sertoli. En las áreas de atrofia focal asociadas sólo con la presencia de espermatoцитos primarios, se ha visto un descenso más intenso de la concentración microdensitométrica de Inhibina B, en comparación con las áreas u asociaciones en donde están presentes una mayor maduración del epitelio seminífero, con presencia de espermatoцитos secundarios ($p < 0.001$).

En los pacientes con criptorquidia orquiectomizados después de la pubertad, se ha visto que aquellos tubos que habían crecido con la pubertad siempre presentaban expresión de Inhibina B y de RA, aunque cuantitativamente menos intensas que en el testículo normal ($p < 0.001$); mientras que en los tubos de tipo infantil, con profundas lesiones disgenéticas de las células de Sertoli, el inmunomarcaje de Inhibina B y de RA era muy débil o estaba ausente.

Conclusiones. La comparación de todos estos datos inmunohistoquímicos y cuantitativos de la expresión de Inhibina B y del RA se ha asociado con los diferentes estadios madurativos de la espermatogénesis del testículo humano normal. En las áreas de hipoespermatogénesis, se ha demostrado una disminución de la expresión de Inhibina B, tanto en el citoplasma basal, como en el adluminal de las células de Sertoli. Además, una disminución significativa de la expresión del RA de las células de Sertoli se ha visto en las áreas de atrofia tubular. En la criptorquidia, la disminución de la expresión de Inhibina B y del RA de las células de Sertoli y de Leydig se relaciona con hipoespermatogénesis, atrofia tubular y lesiones disgenéticas de los tubos seminíferos frecuentemente observadas en estos pacientes. La disminución de la expresión de la Inhibina B y del RA en las células de Sertoli pueden ser la causa o la consecuencia de una profunda e irreversible alteración primaria de la función de las células de Sertoli. Además, los datos obtenidos permiten sugerir una abolición de la regulación paracrina entre las células germinales, las células de Sertoli y las células de Leydig en las lesiones disgenéticas presentes en los pacientes con criptorquidia.

SUMMARY

SUMMARY

Introduction. The determination of the serum inhibin B has been recently correlated to the function of the Sertoli cell in normal man; however, a discrepancy of serum inhibin B level was reported in different subfertility pathologies.

The immunohistochemical (IH) detection of the inhibin B and Androgen Receptor (AR) been demonstrated in the human normal Sertoli cell and in Sertoli cell tumors. The aim of the present study was to explore: 1) the IH relation between Sertoli cell inhibin B and AR expression and the grade of seminiferous tubules maturative stages. The inhibin B was evaluated at both basal and adluminal intracytoplasmatic areas of the Sertoli cells; and 2) changes of inhibin B and AR expression in relation to focal hypospermatogenesis and tubular seminiferous atrophy, and 3) the quantitative values of the Inhibin B and RA expression in Sertoli cells and Leydig cells found in disgenetic cryptorchid testis were determined, in comparison to the pubertal tubules.

Methods. Inhibin B and AR IH staining was performed in all testicular samples, using anti inhibin B antibody (DAKO) at 1/400 dilution, and anti AR antibody (DAKO) at 1/400 dilution. Then, the quantification of intranuclear expression of AR, and the inhibin B expression in both basal and adluminal cytoplasm of Sertoli cells was carried out, using a Leica software in a 3000 μm^2 area of each testicular samples.

Results. In normal seminiferous tubules, basal inhibin B expression is significantly higher than adluminal compartment expression. In relation to stages of spermatogenesis, a low adluminal inhibin B immunostain of Sertoli cells are observed in areas next to both immature ($p < 0.001$) and mature ($p < 0.001$) spermatids associations. However, the signification was lower ($p < 0.05$) when considered the primary spermatocyte stage maturation. A variable intranuclear AR expression in Sertoli cells was seen.

In the areas of the seminiferous tubules with focal hypospermatogenesis, a decrease of inhibin B expression was observed along the length of Sertoli cell cytoplasm. Additionally, in these tubules, a similar decreasing trend of adluminal inhibin B expression was found like in normal seminiferous tubules. In the focal atrophic area associated with primary spermatocytes, a more intense decrease of both inhibin B and AR concentrations was obtained

in comparison with secondary spermatocytes association ($p<0.001$). In all the mature stages of spermatogenesis, a significant positive correlation ($p<0.001$) of the adluminal inhibin B expression between normal and pathological tubules was found.

In patients with cryptorchidism surgically treated after puberty, a lower intensity of inhibin B and AR expression was seen in the pubertal tubule, compared to observe in the normal testis ($p<0.001$). Additionally, in the same cryptorchid testis, the areas that contained immature fetal or infantile tubes showed deep dysgenetic Sertoli cell lesions, associated to an insignificant or absent of the inhibin B and AR expression.

Conclusions. These IH and quantitative data suggest a high inhibin B concentration in the Sertoli cell associated to all different stages of the normal spermatogenesis. In the areas of focal hypospermatogenesis, lower inhibin B expression was demonstrated both in basal and adluminal Sertoli cell cytoplasm. Additionally, a significant decrease of AR immunostain was found in relation to tubular atrophy. In cryptorchidism, the decreased inhibin B and AR expression in the Sertoli cells and Leydig cells were related to the hypospermatogenesis, tubular atrophy and dysgenetic lesions of the seminiferous tubules frequently seen in these patients. The decreased inhibin B and AR expression in the Sertoli cells would be the cause or the consequence of a deep and irreversible primary alteration of Sertoli cell function. Moreover, the data suggest that the germinal cells, Sertoli cell and Leydig cells paracrine regulations are abolished in the dysgenetic lesions found in cryptorchid patients.

REFERENCIAS

1. **Abel MH, Baker PJ, Charlton HM, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Guillou F, O'Shaughnessy PJ.** Spermatogenesis and Sertoli cell activity in mice lacking Sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen. *Endocrinology* 2008;149:3279-3285.
2. **Adamopoulos DA, Koukkou EG.** Value of FSH and inhibin-B measurements in the diagnosis of azoospermia--a clinician's overview. *Int J Androl* 2010;33:e109-113.
3. **Adly MA, Hussein MR.** Immunohistological profile of the Ras homologous B protein (RhoB) in human testes showing normal spermatogenesis, spermatogenic arrest and Sertoli cell only syndrome. *Pathol Oncol Res* 2009. [Epub ahead of print].
4. **Aks glaede L, Petersen JH, Main KM, Skakkebaek NE, Juul A.** High normal testosterone levels in infants with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Eur J Endocrinol* 2007;157:345-350.
5. **Albrecht M.** Insights into the nature of human testicular peritubular cells. *Ann Anat* 2009;191:532-540.
6. **Albrecht M, Rämisch R, Köhn FM, Schwarzer JU, Mayerhofer A.** Isolation and cultivation of human testicular peritubular cells: a new model for the investigation of fibrotic processes in the human testis and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1956-1960.
7. **Allenby G, Foster PM, Sharpe RM.** Evidence that secretion of immunoactive inhibin by seminiferous tubules from the adult rat testis is regulated by specific germ cell types: correlation between *in vivo* and *in vitro* studies. *Endocrinology* 1991;128:467-476.
8. **Alvarez JG, Storey BT.** Differential incorporation of fatty acids into an peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1995;42:334-346.
9. **Alvarez-Nava F, Gonzalez S, Soto M, Martinez C, Prieto M.** Complete androgen insensitivity syndrome: clinical and anatomopathological findings in 23 patients. *Genet Couns* 1997;8:7-12.
10. **Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNeilly AS, Bremner WJ.** Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3341-3345.
11. **Anderson RA, Irvine DS, Balfour C, Groome NP, Riley SC.** Inhibin B in seminal plasma: testicular origin and relationship to spermatogenesis. *Hum Reprod* 1998;13:920-926.
12. **Andersson AM, Juul A, Petersen JH, Müller J, Groome NP, Skakkebaek NE.** Serum inhibin B in healthy pubertal and adolescent boys: relation to age, stage of puberty, and follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone testosterone, and estradiol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3976-3981.
13. **Andersson AM, Müller J, Skakkebaek NE.** Different roles of prepubertal and postpubertal germ cells and Sertoli cells in the regulation of serum inhibin B levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4451-4458.
14. **Andersson AM, Skakkebaek NE.** Serum inhibin B levels during male childhood and puberty. *Mol Cell Endocrinol* 2001;180:103-107.
15. **Andersson AM, Toppari J, Haavisto AM, Petersen JH, Simell T, Simell O, Skakkebaek NE.** Longitudinal reproductive hormone profiles in infants: peak of inhibin B levels in infant boys exceeds levels in adult men. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:675-681.
16. **Archambeault DR, Yao HH.** Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:10526-10531.
17. **Asatiani K, Gromoll J, Eckardstein SV, Zitzmann M, Nieschlag E, Simoni M.** Distribution and function of FSH receptor genetic variants in normal men. *Andrologia* 2002;34:172-176.
18. **Atanassova NN, Walker M, McKinnell C, Fisher JS, Sharpe RM.** Evidence that androgens and oestrogens, as well as follicle-stimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. *J Endocrinol* 2005;184:107-117.
19. **Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P.** Decline in Semen Quality Among Fertile Men in Paris During the Past 20 Years. *N Engl J Med* 1995;332:281-285.
20. **Bai S, Wilson EM.** Epidermal-growth-

- factor-dependent phosphorylation and ubiquitinylation of MAGE-11 regulates its interaction with the androgen receptor. *Mol Cell Biol* 2008;28:1947-1963.
21. **Ballescá JL, Balasch J, Calafell JM, Alvarez R, Fábregues F, De Osaba MJ, Ascaso C, Vanrell JA.** Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000;15:1734-1738.
 22. **Bangsboll S, Qvist I, Lebech PE, Lewinsky M.** Testicular feminization syndrome and associated gonadal tumors in Denmark. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992;71:63-66.
 23. **Barsoum IB, Yao HH.** Fetal Leydig cells: progenitor cell maintenance and differentiation. *J Androl* 2010;31:11-15.
 24. **Barthold JS, Kumasi-Rivers K, Upadhyay J, Shekarriz B, Imperato-Mcginley J.** Testicular position in the androgen insensitivity syndrome: implications for the role of androgens in testicular descent. *J Urol* 2000;164:497-501.
 25. **Basar MM, Kisa U, Tuglu D, Kacmaz M, Basar H.** The effect of varicocele on seminal plasma and serum inhibin-B levels in adolescent and adult men. *Int Urol Nephrol* 2010;42:47-51.
 26. **Bassas Arnau L.** Exploration of testicular function. *Endocrinol Nutr* 2009;56:18-31.
 27. **Bastida MG, Rey RA, Bergadá I, Bedecarrás P, Andreone L, del Rey G, Boywitt A, Ropelato MG, Cassinelli H, Arcari A, Campo S, Gottlieb S.** Establishment of testicular endocrine function impairment during childhood and puberty in boys with Klinefelter syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;67:863-870.
 28. **Bay K, Andersson AM.** Human testicular insulin-like factor 3: in relation to development, reproductive hormones and andrological disorders. *Int J Androl* 2010.
 29. **Bergadá I, Andreone L, Bedecarrás P, Ropelato MG, Copelli S, Laissue P, Rey RA, Campo S.** Seminiferous tubule function in delayed-onset X-linked adrenal hypoplasia congenita associated with incomplete hypogonadotrophic hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;68:240-246.
 30. **Bergadá I, Milani C, Bedecarrás P, Andreone L, Ropelato MG, Gottlieb S, Bergadá C, Campo S, Rey RA.** Time course of the serum gonadotropin surge, inhibins, and anti-Müllerian hormone in normal newborn males during the first month of life. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4092-4098.
 31. **Bergh A, Cajander S.** Immunohistochemical localization of inhibin-alpha in the testes of normal men and in men with testicular disorders. *Intern J Androl* 1990;13:463-469.
 32. **Bhasin S, Krummen LA, Swerdloff RS, Morelos BS, Kim WH, diZerega GS, Ling N, Esch F, Shimasaki S, Toppari J.** Stage dependent expression of inhibin alpha and beta-B subunits during the cycle of the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 1989;124:987-991.
 33. **Bialas M, Borczyńska A, Rozwadowska N, Fiszer D, Kosicki W, Jedrzejczak P, Kurpisz M.** SCF and c-kit expression profiles in male individuals with normal and impaired spermatogenesis. *Andrologia* 2010;42:83-91.
 34. **Bianca S, Cataliotti A, Bartoloni G, Torrente I, Barrano B, Boemi G, Lo Presti M, Indaco L, Barone C, Ettore G.** Prenatal diagnosis of androgen insensitivity syndrome. *Fetal Diagn Ther* 2009;26:167-169.
 35. **Bonaccorsi L, Muratori M, Carloni V, Zecchi S, Formigli L, Forti G, Baldi E.** Androgen receptor and prostate cancer invasion. *Int J Androl* 2003;26:21-25.
 36. **Boonstra VH, Weber RF, De Jong FH, Hokken-Koelega AC.** Testis function in prepubertal boys and young men born small for gestational age. *Horm Res* 2008;70:357-363.
 37. **Boukari K, Ciampi ML, Guiochon-Mantel A, Young J, Lombès M, Meduri G.** Human fetal testis: source of estrogen and target of estrogen action. *Hum Reprod* 2007;22:1885-1892.
 38. **Boukari K, Meduri G, Brailly-Tabard S, Guibourdenche J, Ciampi ML, Massin N, Martinerie L, Picard JY, Rey R, Lombès M, Young J.** Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Müllerian hormone repression during early human testis development. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1818-1825.
 39. **Brinkmann AO.** Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 2001;179:105-109.

40. **Brown C J, Goss S J, Lubahn D B, Joseph D R, Wilson E M, French F S, Willard H H.** Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* 1989;44:264-269.
41. **Burger HG, Igarashi M.** Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. *Endocrinology* 1988;122:1701-1702.
42. **Bustos-Obregón E, Valenzuela-Estrada M, Rojas M.** Agropesticides and testicular damage. En: Martínez García F, Regadera J (eds). Male Reproduction. Churchill Communications Europe España, 1998:157-264.
43. **Carslen E, Givercman A, Keidin N, Skakkebaek NE.** Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J* 1992;305:600-613.
44. **Casano R, Orlando C, Caldini AL, et al.** Simultaneous measurement of seminal L, carnitine, alfa,1-4 glucosidase, and glyceryl-phosphorylcholine in azoospermic and oligozoospermic patients. *Fertil Steril* 1987; 47:324-328. (*)
45. **Castro-Nallar E, Bacallao K, Parada-Bustamante A, Lardone MC, López PV, Madariaga M, Valdevenito R, Piottante A, Ebensperger M, Castro A.** Androgen receptor gene CAG and GGN repeat polymorphisms in Chilean men with primary severe spermatogenic failure. *J Androl* 2010.
46. **Chemes HE, Rey RA, Nistal M, Regadera J, Musse M, González-Peramato P, Serrano A.** Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in Sertoli Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4408-4412.
47. **Cheng CY, Mruk DD.** A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6:380-395.
48. **Comhaire FH, De Kretser DM, Farley TM, Rowe PJ.** Toward more objectivity in diagnosis a management of male infertility. *Int J Androl* 1987;7 (suppl):1-53.
49. **Cooper TG, Hellenkemper B, Jonckhere J, Callewaert N, Grootenhuis AJ, Kersemaekers WM, Leung A, Wang C.** Andrology Lab Corner: Azoospermia: Virtual Reality or Possible to Quantify. *J Androl* 2006;27:483-490.
50. **Cortes D, Müller J, Skakkebaek NE.** Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Intern J Androl* 1987;10:589-596.
51. **Cowan G, Childs AJ, Anderson RA, Saunders PT.** Establishment of long-term monolayer cultures of somatic cells from human fetal testes and expansion of peritubular myoid cells in the presence of androgen. *Reproduction* 2010;139:749-757.
52. **Crosignani PG, Rubin B.** The ESHRE Capri Workshop. Guidelines to the prevalence, diagnosis, treatment and management of infertility. *Hum Reprod* 1996;11:1775-1807.
53. **Dadfar M, Ahangarpour A, Habiby A, Khazaely D.** Pre-operative serum level of inhibin B as a predictor of spermatogenesis improvement after varicocelelectomy. *Urol J* 2010;7:110-114.
54. **Dakouane-Giudicelli M, Legrand B, Bergere M, Giudicelli Y, Cussenot O, Selva J.** Association between androgen receptor gene CAG trinucleotide repeat length and testicular histology in older men. *Fertil Steril* 2006;86:873-877.
55. **Damgaard IN, Main KM, Toppari J, Skakkebaek NE.** Impact of exposure to endocrine disrupters in utero and in childhood on adult reproduction. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002;16:289-309.
56. **De Gendt K, Atanassova N, Tan KA, DeFranca LR, Parreira GG, McKinnell C, Sharpe RM, Saunders PT, Mason JI, Hartung S, Ivell R, Denolet E, Verhoeven G.** Development and function of the adult generation of Leydig cells in mice with Sertoli cell-selective or total ablation of the androgen receptor. *Endocrinology* 2005; 146:4117-4126.
57. **De Kretser DM, Baker HWG.** Human Infertility: The Male Factor. En: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z (eds). Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996:2031-2061.
58. **De Kretser DM, McFarlane JR.** Inhibin in the male. *J Androl* 1996;17:179-182.
59. **Denmeade S R, Sokoll L J, Dalrymple S, Rosen D M, Gady A M, Bruzek D, Ricklis R M, Isaacs J T.** Dissociation between

- androgen responsiveness for malignant growth vs expression of prostate specific differentiation markers PSA, hK2, and PSMA in human prostate cancer models. *Prostate* 2003;54:249-257.
60. Denolet E, De Gendt K, Allemeersch J, Engelen K, Marchal K, Van Hummelen P, Tan K A, Sharpe R M, Saunders P T, Swinnen J V, Verhoeven G. The effect of a Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor on testicular gene expression in prepubertal mice. *Mol Endocrinol* 2006;20:321-334.
 61. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of Leukocyspermia on Sperm DNA Integrity: A negative Effect in Abnormal Semen Samples. *J Androl* 2002;23:717-723.
 62. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online* 2007;14:734-745.
 63. Ferlin A, Zuccarello D, Garolla A, Selice R, Foresta C. Hormonal and genetic control of testicular descent. *Reprod Biomed Online* 2007;15:659-665.
 64. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003;24:59-66.
 65. Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of Hormones, Genes, and Environment in Human Cryptorchidism. *Endocr Rev* 2008;29:560-580.
 66. Forti G, Krausz C. Evaluation and treatment of the infertile couple. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4177-4178.
 67. Forti G, Vannelli GB, Barni T, Balboni GC, Orlando C, Serio M. Sertoli-germ cells interactions in the human testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;43:419-422.
 68. Gaddipati J P, McLeod D G, Heidenberg H B, Sesterhenn I A, Finger M J, Moul J W, Srivastava S. Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. *Cancer Res* 1994;54:2861-2864.
 69. Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertil Steril* 2008; 90:328-334.
 70. Galo ED, González-Peramato P, Gómez-Pérez R, Nistal M, Regadera J. Cambios de expresión del receptor de andrógenos en relación con la subfertilidad del varón. *Asebir* 2006;11:32-39.
 71. García MC, López M, Alvarez CV, Casanueva F, Tena-Sempere M, Diéguez C. Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction* 2007;133:531-540.
 72. Giagulli VA, Carbone D. Hormonal control of inhibin B in men. *J Endocrinol Invest* 2006;29:706-713.
 73. Globerman H, Shen-Orr Z, Karnieli E, Aloni Y, Charuzi I. Inhibin B in men with severe obesity and after weight reduction following gastropasty. *Endocr Res* 2005;31:17-26.
 74. Gómez E, Irvine DS, Aitken RJ. Evaluation of spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationship with sperm quality and sperm function. *Int J Androl* 1998;21:81-94.
 75. Gómez-Pérez R, Osuna JA, Arata-Bellabarba G. Surgical vs. untreated cryptorchidism: effects on fertility. *Arch Androl* 2004;50:19-22.
 76. Gordon Baker HW. Clinical Management of Male Infertility. En: DeGroot LJ, Jameson JL (eds). Clinical Management of Male Infertility. Elsevier Suander, 5th. Ed. Philadelphia 2006. pp 3199-3226.
 77. Goulis DG, Polychronou P, Mikos T, Grimbizis G, Gerou S, Pavlidou V, Papanikolaou A, Tarlatzis BC, Bontis IN, Papadimas I. Serum inhibin-B and follicle stimulating hormone as predictors of the presence of sperm in testicular fine needle aspirate in men with azoospermia. *Hormones (Athens)* 2008;7:140-147.
 78. Gray RH. Epidemiology of infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1990;2:154-158.
 79. Gray AM, Mason AJ. Requirement for activin A and transforming growth factor-beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 1990;247:1328-1330.
 80. Grinspon RP, Rey RA. Anti-müllerian hormone and sertoli cell function in paediatric male hypogonadism. *Horm Res Paediatr* 2010;73:81-92.
 81. Grootenhuys AJ, Timmerman MA, Hordijk PL, DeJong FH. Inhibin in immature rat Sertoli cell conditioned

- medium: a 32 kDa alfa beta-B dimer. *Mol Cell Endocrinol* 1990;70:109-116.
82. **Guitton N, Touzalin AM, Sharpe RM, Cheng CY, Pinon-Lataillade G, Méritte H, Chenal C, Jégou B.** Regulatory influence of germ cells on Sertoli cell function in the pre-pubertal rat after acute irradiation of the testis. *Intern J Androl* 2000;23:332-339.
 83. **Guzick DS.** Human Infertility: An Introduction. En: Adashi EY, Rock JA., Rosenwaks Z (eds). Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996:1897-1913.
 84. **Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL; National Cooperative Reproductive Medicine Network.** Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;345:1388-1393.
 85. **Halder A, Fauzdar A, Kumar A.** Serum inhibin B and follicle-stimulating hormone levels as markers in the evaluation of azoospermic men: a comparison. *Andrologia* 2005;37:173-179.
 86. **Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Hamilton BD, Carrell DT.** Obesity and Male Reproduction Potential. *J Androl* 2006;27:619-626.
 87. **Hou W, Hu J, Li Y, Zhao J, Li Z, Liu X, Yao L, Zhang Y.** Altered expression of NDRG2 in the testes of experimental rat model of cryptorchidism. *Urology* 2010;75:985-991.
 88. **Hu Z, Dandekar D, O'Shaughnessy PJ, De Gendt K, Verhoeven G, Wilkinson MF.** Androgen-induced Rhox homeobox genes modulate the expression of AR-regulated genes. *Mol Endocrinol* 2010;24:60-75.
 89. **Hughes IA, Acerini CL.** Factors controlling testis descent. *Eur J Endocrinol* 2008;159 Suppl 1:S75-82.
 90. **Hutchison GR, Scott HM, Walker M, McKinnell C, Ferrara D, Mahood IK, Sharpe RM.** Sertoli cell development and function in an animal model of testicular dysgenesis syndrome. *Biol Reprod* 2008;78:352-360.
 91. **Illingworth PJ, Groome NP, Byrd W, Rainey WE, McNeilly AS, Mather JP, Bremner WJ.** Inhibin B: a likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1321-1325.
 92. **Jordan CL, Doncarlos L.** Androgens in health and disease: an overview. *Horm Behav* 2008;53:589-595.
 93. **Józsa T, Dienes B, Telek A, Hargitai Z, Pór A, Kiss C.** Differential expression of androgen and estrogen receptor of appendix testis in patients with descended and undescended testes. *Int J Urol* 2008;15:171-174.
 94. **Kamischke A, Simoni M, Schrameyer K, Lerchl A, Nieschlag E.** Is inhibin B a pharmacodynamic parameter for FSH in normal men? *Eur J Endocrinol* 2001;144:629-637.
 95. **Kim Y, Kim JS, Song MS, Seo HS, Kim JC, Bae CS, Kim S, Shin T, Kim SH, Moon C.** The expression and localization of inhibin isotypes in mouse testis during postnatal development. *J Vet Sci* 2008;9:345-349.
 96. **Klaaij IA, van Pelt AM, Timmerman MA, Blok LJ, DeRooij DG, DeJong FH.** Expression of inhibin subunit mRNAs and inhibin levels in the testes of rats with stage-synchronized spermatogenesis. *J Endocrinol* 1994;141:131-141.
 97. **Koduri S, Hild SA, Pessaint L, Reel JR, Attardi BJ.** Mechanism of action of l-CDB-4022, a potential nonhormonal male contraceptive, in the seminiferous epithelium of the rat testis. *Endocrinology* 2008;149:1850-1860.
 98. **Kolb BA, Stanczyk FZ, Sokol RZ.** Serum inhibin B levels in males with gonadal dysfunction. *Fertil Steril* 2000;74:234-238.
 99. **Kopera IA, Bilinska B, Cheng CY, Mruk DD.** Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;365:1593-1605.
 100. **Krausz C, Giachini C.** Genetic risk factors in male infertility. *Arch Androl* 2007;53:125-133.
 101. **Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S.** Predictive value of human sperm morphology in *in vitro* fertilisation. *Fertil Steril* 1988;49:112-17.
 102. **La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artenisio AC, Stabile G, Volpe A.** Anti-Müllerian

- hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 2010;16:113-130.
103. **Lan KC, Hseh CY, Lu SY, Chang SY, Shyr CR, Chen YT, Kang HY, Huang KE.** Expression of androgen receptor co-regulators in the testes of men with azoospermia. *Fertil Steril* 2008;89:S1397-S1405.
 104. **Loukil LH, Boudawara TS, Ayadi I, Bahloul A, Jlidi R, Ayadi H, Keskes LA.** High androgen receptor immunoexpression in human "Sertoli cell only" testis. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2005;82:47-51.
 105. **Majdic G, McNeilly AS, Sharpe RM, Evans LR, Groome NP, Saunders PT.** Testicular expression of inhibin and activin subunits and follistatin in the rat and human fetus and neonate and during postnatal development in the rat. *Endocrinology* 1997;138:2136-2147.
 106. **Mason AJ.** Functional analysis of the cysteine residues of activin A. *Mol Endocrinol* 1994;8:325-332.
 107. **Mather JP, Moore A, LI RH.** Activins, inhibins, and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;215:209-222.
 108. **Meachem RB, Lipshultz LI, Howard SS.** Male infertility. In: Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, Duckett JW, eds. *Adult and Pediatric Urology*. St Louis: Mosby-Year Boook Inc;1996:1747-1802.
 109. **Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M.** Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *Eur J Endocrinol* 2001;145:561-571.
 110. **Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE.** Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16696-16700.
 111. **Merchenthaler I, Culler MD, Petrusz P, Negro-Vilar A.** Immunocytochemical localization of inhibin in rat and human reproductive tissues. *Mol Cell Endocrinol* 1987;54:239-243.
 112. **Mitchell V, Boitrelle F, Pigny P, Robin G, Marchetti C, Marcelli F, Rigot JM.** Seminal plasma levels of anti-Müllerian hormone and inhibin B are not predictive of testicular sperm retrieval in nonobstructive azoospermia: a study of 139 men. *Fertil Steril* 2010. [Epub ahead of print].
 113. **Moldenhauer JS, Ostermeier GC, Johnson A, Diamond MP, Krawetz SA.** Diagnosing male factor infertility by microarrays. *J Androl* 2003;24:783-789.
 114. **Mruk DD, Cheng CY.** Tight junctions in the testis: new perspectives. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010 365:1621-1635.
 115. **Myers GM, Lambert-Messerlian GM, Sigman M.** Inhibin B reference data for fertile and infertile men in Northeast America. *Fertil Steril* 2009;92:1920-1923.
 116. **Nagata Y, Fujita K, Banzai J, Kojima Y, Kasima K, Suzuki M, Tanaka K.** Seminal plasma inhibin-B level is a useful predictor of the success of conventional testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia. *J Obstet Gynaecol Res* 2005;31:384-388.
 117. **Newmark J R, Hardy D O, Tonb D C, Carter B S, Epstein J I, Isaacs W B, Brown T R, Barrack E R.** Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6319-6323.
 118. **Nistal M, Castillo C, Regadera J, Garcia-Cabezas MA.** Adenomatous hyperplasia of the rete testis. A review and report of new cases. *Histol Histopathol* 2003;18:741-752.
 119. **Nistal M, Gonzalez-Peramato P, Paniagua R.** Diagnostic value of differential quantification of spermatids in obstructive azoospermia. *J Androl* 2003;24:721-726.
 120. **Nistal M, Gonzalez-Peramato P, Regadera J, Serrano A, Tarin V, De Miguel MP.** Primary testicular lesions are associated with testicular germ cell tumors of adult men. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1260-1268.
 121. **Nistal M, Gonzalez-Peramato P, Serrano A, Regadera J.** Xanthogranulomatous Funiculitis and Orchio-Epididymitis. Report of Two Cases with Immunohistochemical Study and Literature Review. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:911-914.
 122. **Nistal M, Paniagua R.** Non-neoplastic diseases of the testis. In: Bostwick DG and Cheng L (eds.). *Urologic Surgical Pathology*. Chap 12. Mosby Elsevier Inc. St Louis, 2008:615-755.
 123. **Nistal M, Paniagua R, Diez-Pardo JA.** Histologic classification of undescended testes. *Hum Pathol* 1980;11:666-674.
 124. **Nistal M, Paniagua R, Regadera J,**

- Santamaría L.** Obstruction of the tubuli recti and ductuli efferentes by dilated veins in the testes of men with varicocele and its possible role in causing atrophy of the seminiferous tubules. *Intern J Androl* 1984;7:309-323.
125. **Nistal M, Regadera J, Winitzky P, Tejerina E, Cheme H.** Granular changes in Sertoli cells in children and pubertal patients. *Fertil Steril* 2005;83:1489-1499.
 126. **Nistal M, Santamaria L, Paniagua R.** Quantitative and ultrastructural study of Leydig cells in Klinefelter's syndrome. *J Pathol* 1985;146:323-331.
 127. **O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Abel MH.** Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction* 2010;139:177-184.
 128. **O'Shaughnessy PJ, Verhoeven G, De Gendt K, Monteiro A, Abel MH.** Direct action through the Sertoli cells is essential for androgen stimulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 2010;151: 2343-2348.
 129. **Osuna JA, Gómez-Pérez R, Arata-Bellabarba G, Villaroel V.** Relationship between BMI, total testosterone, sex hormone-binding-globulin, leptin, insulin and insulin resistance in obese men. *Arch Androl* 2006;52:355-361.
 130. **Patrão MT, Silva EJ, Avellar MC.** Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53:934-945.
 131. **Peeling RW, Brunham RC.** Chlamydia as pathogens: new species and new issues. *Emerg Infect Dis* 1996;2:1-7.
 132. **Petersen C, Soder O.** The Sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res* 2006;66:153-161.
 133. **Pierik FH, Vreeburg JT, Stijnen T, De Jong FH, Weber RF.** Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3110-3114.
 134. **Pineau C, Sharpe RM, Saunders PT, Gerard N, Jegou B.** Regulation of Sertoli cell inhibin production and of inhibin α -subunit mRNA levels by specific germ cell types. *Mol Cell Endocrinol* 1990;72:13-22.
 135. **Pointis G, Gilleron J, Carette D, Segretain D.** Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365:1607-1620.
 136. **Qamar I, Park E, Gong EY, Lee HJ, Lee K.** ARR19 (androgen receptor corepressor of 19 kDa), an antisteroidogenic factor, is regulated by GATA-1 in testicular Leydig cells. *J Biol Chem* 2009;284:18021-18032.
 137. **Quigley C A, De Bellis A, Marschke K B, El-Awady M K, Wilson E M, French F S.** Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspective. *Endocrine Rev* 1995;16:271-321.
 138. **Rabinovici J, Goldsmith PC, Roberts VJ, Vaughan J, Vale W, Jaffe RB.** Localization and secretion of inhibin/activin subunits in the human and subhuman primate fetal gonads. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:1141-1149.
 139. **Radicioni AF, Anzuini A, De Marco E, Nofroni I, Castracane VD, Lenzi A.** Changes in serum inhibin B during normal male puberty. *Eur J Endocrinol* 2005;152 403-409.
 140. **Raivio T, Toppari J, Perheentupa A, McNeilly AS, Dunkel L.** Treatment of prepubertal gonadotrophin-deficient boys with recombinant human follicle-stimulating hormone. *Lancet* 1997;350:263-264.
 141. **Ramaswamy S, Marshall GR, McNeilly AS, Plant TM.** Evidence that in a physiological setting Sertoli cell number is the major determinant of circulating concentrations of inhibin B in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Androl* 1999;20:430-434.
 142. **Regadera J, Martinez-Garcia F, Gonzalez-Peramato P, Serrano A, Nistal M, Suarez-Quian C.** Androgen receptor expression in Sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;186:413-421.
 143. **Regadera J, Martínez-García F, Paniagua R, Nistal M.** Androgen insensitivity syndrome: An immunohistochemical, ultrastructural and morphometric study. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:225-234.
 144. **Rey RA, Musse M, Venara M, Chemes HE.** Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc*

- Res Tech* 2009;72:787-795.
145. **Roberts VJ.** Tissue-specific expression of inhibin/activin subunit and follistatin mRNAs in mid- to late-gestational age human fetal testis and epididymis. *Endocrine* 1997;6:85-90.
 146. **Roberts V, Meunier H, Sawchenko PE, Vale W.** Differential production and regulation of inhibin subunits in rat testicular cell types. *Endocrinology* 1989;125:2350-2359.
 147. **Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, Mujtaba R.** Role of environmental estrogens in the deterioration of male fertility. *Fertil Steril* 2002;78:1887-1894.
 148. **Saleh R, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ et al.** Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril* 2002;78:1215-1224.
 149. **Sampson N, Untergasser G, Plas E, Berger P.** The ageing male reproductive tract. *J Pathol* 2007;211:206-218.
 150. **Scott HM, Hutchison GR, Mahood IK, Hallmark N, Welsh M, De Gendt K, Verhoeven G, O'Shaughnessy P, Sharpe RM.** Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis. *Endocrinology* 2007;148:2027-2036.
 151. **Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS.** Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003;125:769-784.
 152. **Simoni M, Tüttelmann F, Michel C, Böckenfeld Y, Nieschlag E, Gromoll J.** Polymorphisms of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene: association with maldescended testes and male infertility. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18:193-200.
 153. **Simorangkir DR, Marshall GR, Plant TM.** Sertoli cell proliferation during prepubertal development in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) is maximal during infancy when gonadotropin secretion is robust. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4984-4989.
 154. **Skinner MK, McLachlan RI, Bremner WJ.** Stimulation of Sertoli cell inhibin secretion by the testicular paracrine factor PModS. *Mol Cell Endocrinol* 1989;66:239-249.
 155. **Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N.** Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;109:323-330.
 156. **Steinberger A, Steinberger E.** Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 1976;99:918-921.
 157. **Stewart J, Turner KJ.** Inhibin B as a potential biomarker of testicular toxicity. *Cancer Biomark* 2005;1:75-91.
 158. **Suarez-Quian CA, Martínez-García F, Nistal M, Regadera J.** Androgen Receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:350-358.
 159. **Sun JG, Jurisicova A, Casper RF.** Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56:602-607.
 160. **Svechnikov K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Colón E, Svechnikova I, Söder O.** Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr* 2010;73:93-101.
 161. **Templeton A, Fraser C, Thompson B.** Infertility-Epidemiology and referral practice. *Hum Reprod* 1991;10:1391-1394.
 162. **Thomas J, Fishel SB, Hall JA, Green S, Newton TA, Thorton SJ.** Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology. *Hum Reprod* 1997;12:2418-2421.
 163. **Tortolero I, Bellabarba-Arata G, Lozano R, Bellabarba C, Cruz I, Osuna JA.** Semen analysis in Men from Mérida-Venezuela Over a 15 Year Period. *Arch Androl* 1999;42:29-34.
 164. **Toulis KA, Iliadou PK, Venetis CA, Tsametis C, Tarlatzis BC, Papadimas I, Goulis DG.** Inhibin B and anti-Müllerian hormone as markers of persistent spermatogenesis in men with non-obstructive azoospermia: a meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Hum Reprod Update* 2010.
 165. **Trsinar B, Muravec UR.** Fertility potential after unilateral and bilateral orchidopexy for cryptorchidism. *World J Urol* 2009;27:513-519.
 166. **Tsigkou A, Luisi S, Reis FM, Petraglia F.** Inhibins as diagnostic markers in human reproduction. *Adv Clin Chem* 2008;45:1-29.
 167. **Tunc L, Kirac M, Gurocak S, Yucel A, Kupeli B, Alkibay T, Bozkirli I.** Can serum

- inhibin B and FSH levels, testicular histology and volume predict the outcome of testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia? *Int Urol Nephrol* 2006;38:629-635.
168. **Tüttelmann F, Dykstra N, Themmen AP, Visser JA, Nieschlag E, Simoni M.** Anti-Müllerian hormone in men with normal and reduced sperm concentration and men with mal descended testes. *Fertil Steril* 2009; 91:1812-1819.
 169. **Van Roijen JH, Van Assen S, Van Der Kwast TH, De Rooij DG, Boersma J, Vreeburg JT, Weber RF.** Androgen receptor immunoexpression in the testes of subfertile men. *J Androl* 1995;16:510-516.
 170. **Verhoeven G, Franchimont P.** Regulation of inhibin secretion by Sertoli cell-enriched cultures. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1983; 102:136-143.
 171. **Verhoeven G, Willems A, Denolet E, Swinnen JV, De Gendt K.** Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;365:1537-1556.
 172. **Vigil PP, Ceroni VM, Merino OP, Salgado AM.** Infección genito-urinaria en infertilidad masculina. *Actualidad andrológica* 2002;10:54-61.
 173. **Virtanen HE, Bjerknes R, Cortes D, Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Thorsson AV, Thorup J, Main KM.** Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatr* 2007 96:611-616.
 174. **Vliegen MK, Schlatt S, Weinbauer GF, Bergmann M, Groome NP, Nieschlag E.** Localization of inhibin/activin subunits in the testis of adult nonhuman primates and men. *Cell Tissue Res* 1993;273:261-268.
 175. **Wallace EM, Groome NP, Riley SC, Parker AC, Wu FC.** Effects of chemotherapy-induced testicular damage on inhibin, gonadotropin, and testosterone secretion: a prospective longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3111-3115.
 176. **Walters KA, Simanainen U, Handelsman DJ.** Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Hum Reprod Update* 2010. [Epub ahead of print].
 177. **Wang G, Weng CC, Shao SH, Zhou W, De Gendt K, Braun RE, Verhoeven G, Meistrich ML.** Androgen receptor in Sertoli cells is not required for testosterone-induced suppression of spermatogenesis, but contributes to Sertoli cell organization in *Utp14b^{jsd}* mice. *J Androl* 2009;30:338-348.
 178. **Wang RS, Yeh S, Chen LM, Lin HY, Zhang C, Ni J, Wu CC, di Sant'Agnese PA, DeMesy-Bentley KL, Tzeng CR, Chang C.** Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology* 2006;147:5624-5633.
 179. **Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C.** Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev* 2009;30:119-132.
 180. **Welsh M, Saunders PT, Atanassova N, Sharpe RM, Smith LB.** Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J* 2009;23:4218-4230.
 181. **WHO.** Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Fourth edition. Cambridge University Press: 2000.
 182. **Wiener J S, Marcelli M, Gonzales E T Jr, Roth D R, Lamb D J.** Androgen receptor gene alterations are not associated with isolated cryptorchidism. *J Urol* 1998;160: 863-865.
 183. **Wikström AM, Dunkel L.** Testicular function in Klinefelter syndrome. *Horm Res* 2008;69:317-326.
 184. **Wikström AM, Hoei-Hansen CE, Dunkel L, Rajpert-De Meyts E.** Immunoexpression of androgen receptor and nine markers of maturation in the testes of adolescent boys with Klinefelter syndrome: evidence for degeneration of germ cells at the onset of meiosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:714-719.
 185. **Winters SJ, Plant TM.** Partial characterization of circulating inhibin-B and pro-alpha C during development in the male rhesus monkey. *Endocrinology* 1999;140: 5497-5504.
 186. **Winters SJ, Wang C, Abdelrahman E, Hadeed V, Dyky MA, Brufsky A.** Inhibin-B levels in healthy young adult men and prepubertal boys: is obesity the cause for the contemporary decline in sperm count because of fewer Sertoli cells? *J Androl* 2006;27:560-564.

-
187. **Wolff H, Anderson DJ.** Immunohistologic characteritization and quantitation of leucocytes subpopulations in human semen. *Fertil Steril* 1988;49:497-504.
188. **Wu X, Arumugam R, Zhang N, Lee MM.** Androgen profiles during pubertal Leydig cell development in mice. *Reproduction* 2010;140:113-121.
189. **Yu CH, Hwang DN, Yhee JY, Kim JH, Im KS, Nho WG, Lyoo YS, Sur JH.** Comparative immunohistochemical characterization of canine seminomas and Sertoli cell tumors. *J Vet Sci* 2009;10:1-7.
190. **Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, Wang RS, Chang YJ, Mendis-Handagama C, Hu L, Lardy H, Chang C.** Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:17718-17723.
191. **Zhang T, Zhou HM, Liu YX.** Expression of plasminogen activator and inhibitor, urokinase receptor and inhibin subunits in rhesus monkey testes. *Mol Hum Reprod* 1997;3:223-231.
192. **Zhou X.** Roles of androgen receptor in male and female reproduction: lessons from global and cell specific androgen receptor knockout (ARKO) mice. *J Androl* 2009.
193. **Zirkin BR.** Where do adult Leydig cells come from? *Biol Reprod* 2010;82:1019-1020.
194. **Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A, Menegazzo M, De Toni L, Carraro M, Veronese C, Foresta C.** Androgen receptor is expressed in both X- and Y-carrier human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009;91:193-200.